Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf

Prof.Dr.med. F. K. Ohnesorge

Untersuchungen zur Interaktion von Induktoren des mikrosomalen Stoffwechsels der Leber (Methylcholanthren, Phenobarbital) mit Schwermetallen (Cd^{++}, Zn^{++}, Cu^{++}, Pb^{++})

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Peter Welbers

Düsseldorf
1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0054

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf

Prof.Dr.med. F. K. Ohnesorge

Untersuchungen zur Interaktion von Induktoren des mikrosomalen Stoffwechsels der Leber (Methylcholanthren, Phenobarbital) mit Schwermetallen (Cd^{++}, Zn^{++}, Cu^{++}, Pb^{++})

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Peter Welbers

Düsseldorf
1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof.Dr. Brüster

Referent
gez.: Prof.Dr. Ohnesorge
gez.: Priv.-Doz.Dr. Kappus

Zum Druck genehmigt, Düsseldorf, den 26.1o.1982
Tag der mündlichen Prüfung: 2o.1o.1982

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1.	Einleitung	1
1.1.1.	Mikrosomaler Stoffwechsel	1
1.1.2.	Induktion	2
1.1.3.	Der Metabolismus von Hexobarbital und Zoxazolamin	3
1.1.3.1.	Hexobarbital	3
1.1.3.2.	Zoxazolamin	4
1.1.4.	Wirkungen von einigen Schwermetallen auf mikrosomale Enzyme und den Hämstoffwechsel	4
1.1.4.1.	Cadmium	5
1.1.4.2.	Blei	6
1.1.4.3.	Kupfer	6
1.1.4.4.	Zink	6
1.1.5.	Metallothionein und dessen Wechselwirkungen mit einigen Schwermetallen	7
1.1.6.	Schwermetalle und deren Aufnahme, Anreicherung und Bedeutung im menschlichen Organismus	8
1.1.6.1.	Cadmium	8
1.1.6.2.	Blei	8
1.1.6.3.	Kupfer	9
1.1.6.4.	Zink	9
1.2.	Fragestellung	1o
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Abkürzungen	12
2.2.	Chemikalien	13
2.3.	Tiermaterial, Applikationsweg	14
2.4.	Messung der Schlaf- und Paralysezeiten	14
2.4.1.	Versuchsaufbau	14
2.4.2.	Lösungsmittel und Dosierung	15
2.4.3.	Zeitlicher Ablauf der Versuche	15
2.4.4.	Statistik	16
2.5.	Biochemische Bestimmungen	16
2.5.1.	Behandlung der Tiere	16

		Seite
2.5.2.	Präparation der Mikrosomen	16
2.5.3.	Proteinbestimmungen	17
2.5.4.	Messungen von Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 nach der Methode von Omura und Sato (1964a)	17
2.5.5.	Enzymatische Bestimmungen	17
2.5.5.1.	Glucose-6-Phosphatase	17
2.5.5.2.	DCPIP-Reduktase	17
2.5.5.3.	N-Demethylierung	18
2.5.5.4.	O-Deäthylierung von 7-Äthoxycumarin	18
2.5.5.5.	Biphenyl-Hydroxylierung zu 2-OH- und 4-OH-Biphenyl	19
2.5.6.	Statistik	2o
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Schlaf- und Paralysezeiten	21
3.1.1.	Schwermetallgabe ohne Induktor	21
3.1.1.1.	Hexobarbitalschlafzeiten	21
3.1.1.2.	Zoxazolaminparalysezeiten	21
3.1.2.	Schwermetallgabe mit Induktor	24
3.1.2.1.	Hexobarbitalschlafzeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit PB	24
3.1.2.2.	Zoxazolaminparalysezeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit PB	24
3.1.2.3.	Hexobarbitalschlafzeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit MC	24
3.1.2.4.	Zoxazolaminparalysezeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit MC	28
3.1.2.5.	Übersicht	28
3.2.	Relative Lebergewichte, mikrosomale Proteinausbeute und biochemische Ergebnisse	3o
3.2.1.	Relative Lebergewichte (mg/Leber/g Maus)	31
3.2.2.	Mikrosomale Proteinausbeute	32
3.2.3.	Cytochrome P-450 und b_5	32
3.2.3.1.	Cytochrom P-450	32
3.2.3.2.	Cytochrom b_5	32
3.2.4.	Enzymatische Bestimmungen	35
3.2.4.1.	Glucose-6-Phosphatase	35
3.2.4.2.	DCPIP-Reduktase	35
3.2.4.3.	Äthylmorphin-Demethylierung und 4-DMAB-Demethylierung	35

Seite

3.2.4.4. Äthoxycumarindeäthylierung und deren Hemmung nach Zusatz von αNF oder MP 36

3.2.4.4.2. Hemmung der mikrosomalen Aktivität der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycumarin nach Zusatz von αNF und MP 36

3.2.4.5. Biphenyl-2-Hydroxylierung 37

3.2.4.6. Biphenyl-4-Hydroxylierung 37

3.2.4.7. Übersicht 37

4. Diskussion 41

4.1. Vorbemerkung 41

4.2. Wirkungen von Schwermetallen auf Hexobarbital-schlaf- oder Zoxazolaminparalysezeiten 41

4.3. Wirkungen von Schwermetallen in Kombination mit Induktoren 43

4.3.1. Cadmium in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren 44

4.3.2. Zink in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren 45

4.3.3. Kupfer in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren 46

4.3.4. Blei in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren 47

4.3.5. Schwermetalle und Metabolismus der Induktoren 48

5. Zusammenfassung 49

6. Literaturverzeichnis 51

7. Anhang (Tabellen) 57

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1. Mikrosomaler Stoffwechsel

Bei der fraktionierten Zentrifugation von Leberhomogenaten sedimentieren die Membranbruchstücke des endoplasmatischen Retikulums bei 100 000 g und bilden die Mikrosomenfraktion. Sie setzt sich aus einem "rauhen" Anteil, der den kernnahen Anteilen entstammt und dicht mit Ribosomen besetzt ist, sowie dem "glatten" Anteil, der ribosomenfrei ist, zusammen.

Beide Formen unterliegen wie alle Zellorganellen einem ständigen Auf- und Abbau. Die Halbwertzeiten können zwischen 22 und 110 Stunden schwanken.

Insgesamt sind etwa 50 verschiedene Enzymaktivitäten in Mikrosomen bekannt. Die Konzentration von 5 Enzymen, deren Molekulargewicht errechnet werden konnte, beträgt etwa 8 - 10 % des gesamten mikrosomalen Proteins. Postuliert man bei den restlichen 45 Enzymen ähnliche Molekulargewichte, so wäre mit diesen 50 bekannten Enzymaktivitäten die gesamte mikrosomale Fraktion erfaßt (Schulze und Staudinger, 1972).

Das Schlauchsystem des endoplasmatischen Retikulums dient dem Transport und dem Metabolismus von körpereigenen und körperfremden Stoffen. Unter anderem werden lipoidlösliche Substrate aus dem Cytoplasma oxydiert, reduziert oder hydratisiert und dann durch Konjugation mit Glucuronsäure, Schwefelsäure oder Glutathion biologisch inaktiviert und wasserlöslich gemacht. Die Reaktionsprodukte im Lumen des endoplasmatischen Retikulums gelangen von dort in den extrazellulären Raum.

Mikrosomale Enzyme, die sowohl NADPH oder NADH als auch Sauerstoff benötigen, werden in ihrer Gesamtheit als mischfunktionelle Oxidasen (Mason, 1957) oder Monooxygenasen (Hayaishi, 1962) des endoplasmatischen Retikulums bezeichnet.

Dieser Multienzymkomplex besteht bei allen bisher untersuchten Arten aus einer noch nicht genau bekannten Anzahl von Apoproteinen, die als Coenzym neben NADPH alle ein Hämoporphyrin vom b-Typ benötigen, das kovalent gebun-

den ist. Dieses Chromophor bindet CO in reduziertem Zustand sehr fest. Gleichzeitig entsteht, abhängig von der Tertiärstruktur des Apoprotein-Hämoporphyrin-Komplexes, eine starke Absorption ($\Delta\varepsilon_{\lambda - 490} = 91\ mM^{-1} \times cm^{-1}$) bei λ = 448 - 452 nm (Oumura, 1964). Wegen dieser Absorptionsbande wird die Enzymgruppe ungefähr seit Beginn der sechziger Jahre als das mikrosomale Cytochrom P-450 bezeichnet. Seither wurde eine große Zahl von P-450-Isoenzymen rein dargestellt und beschrieben.

Für die bisher in hochreiner Form isolierten Cytochrom P-450-abhängigen mikrosomalen Enzymaktivitäten ist die kinetische Beschreibung spezifischer Substrat-Enzymwechselwirkung erst in wenigen Einzelfällen gelungen. Dies mag daran liegen, daß entweder solche spezifischen Wechselwirkungen die Ausnahme oder die meisten der hochgereinigt vorliegenden Aktivitäten bezüglich ihres substratspezifischen Proteinanteils nach wie vor heterogen sind.

Neben dem Cytochrom P-450 sind zur Oxidation das Flavinenzym NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, das die Oxidation von NADPH katalysiert und ein freiwerdendes Elektron auf das Cytochrom überträgt, sowie Phospholipide, vor allem Phosphatidylcholin, notwendig (Gillette et al., 1972; Lu et al., 1969; Lu and Levin, 1974). Die Cytochrom P-450 Reduktase kann in vitro unter anderem auch Cytochrom c reduzieren und ist vermutlich identisch mit der mikrosomalen Cytochrom c Reduktase.

1.1.2. Induktion

Die Aktivität der Cytochrom P-450-abhängigen Enzyme in Lebermikrosomen steigt nach Behandlung mit verschiedenen Hormonen, Medikamenten, Insektiziden oder Kanzerogenen deutlich an. Dieser Aktivitätsanstieg scheint Ausdruck einer erhöhten Enzymproduktion zu sein und wird als Enzyminduktion bezeichnet (Conney, 1967). Die von diesen Enzymen umgesetzten Stoffe sind der induzierenden Substanz oft chemisch ähnlich, können aber auch einen anderen chemischen Aufbau besitzen. Der genaue Wirkungsmechanismus der Enzyminduktion ist unbekannt. Sicher scheint, daß eine Stimulierung der mRNA- und Proteinsynthese damit einhergeht (Conney, 1967; Rees, 1979; Whitlock, 1979).

Es wird grob zwischen Induktoren vom Phenobarbitaltyp einerseits und vom Typ der aromatischen Kohlenwasserstoffe - wie Methylcholanthren - andererseits unterschieden. Die Induktion durch Phenobarbital benötigt 3 - 5 Tage, die durch Methylcholanthren ca. 2 - 3 Tage.

Methylcholanthren führt zu einer selektiven Stimulierung des Metabolismus aromatischer Kohlenwasserstoffe, wogegen Phenobarbital seine stimulierende Wirkung auf den Metabolismus mehrerer, sehr verschiedener Stoffklassen (Barbiturate, Steroide, Kohlenwasserstoffe etc.) ausübt (Conney, 1967). Phenobarbital steigert z.B. die Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase und erhöht die Konzentration von Cytochrom P-450 vor allem in den Lebermikrosomen. Parallel dazu wird die δ-Aminolävulinsäuresynthetase, die gesamte Hämsynthese und die Demethylierung von Äthylmorphin stimuliert. Methylcholanthren dagegen führt unter anderem zu einer Steigerung der N-Demethylierung von Azofarbstoffen und der Hydroxylierung von Biphenyl in 2- und 4-Stellung. Es erhöht ebenfalls den Cytochromgehalt, insbesondere den des Cytochrom P-448, verändert aber nicht die Aktivität der NADPH-Cytochrom *c* Reduktase (Conney, 1967; Gillette et al., 1972). Die Behandlung durch Phenobarbital steigert die Hexobarbitalhydroxylierung und - wenn auch in geringerem Maße als Methylcholanthren - die Zoxazolaminhydroxylierung. Methylcholanthren induziert nur die Zoxazolaminhydroxylierung (Conney, 1967). Deshalb wird die Hydroxylierung von Hexobarbital als Indikator für die Induktion von P-450 Cytochromen durch Phenobarbital und die Hydroxylierung von Zoxazolamin als Indikator für die Induktion von P-448 Cytochromen durch Methylcholanthren angesehen (Conney, 1967; Gillette et al., 1972).

1.1.3. Der Metabolismus von Hexobarbital und Zoxazolamin

1.1.3.1. Hexobarbital

Hexobarbital gehört zur Stoffklasse der Barbiturate und wird als Injektionsnarkotikum verwendet. Es besitzt infolge der N-Methylgruppe und der Anwesenheit eines gesättigten Kohlenwasserstoffringes eine hohe Lipoidlöslichkeit. Dadurch wird der Wirkungseintritt beschleunigt, gleichzeitig aber auch die Geschwindigkeit seines Abbaus erhöht.

Da die Wirkungsdauer des Hexobarbitals stark mit der Aktivität Cytochrom P-450-abhängiger mikrosomaler Enzyme korreliert, kann die Hexobarbitalschlafzeit als in vivo-Parameter für die Induktion der mischfunktionellen Oxidase benutzt werden (s. S. 2). Nach Gerber et al. (197o) beträgt die biologische Halbwertzeit bei Mäusen - definiert als die Zeit, in der die Menge des unmetabolisierten Hexobarbitals im Gesamtorganismus auf die Hälfte des Ausgangswertes sinkt - je nach Stamm der Versuchstiere 15 - 28 Minuten. Die zwei

Hauptmetaboliten des Hexobarbitals sind 3-Hydroxyhexobarbital und 3-Ketohexobarbital, das durch Dehydrogenierung des 3-Hydroxyhexobarbitals entsteht.

1.1.3.2. Zoxazolamin

Zoxazolamin ist ein aromatischer Kohlenwasserstoff, der über einen offenbar zentralnervösen (nicht näher geklärten) Angriffspunkt paralysierend wirkt. Es wird angenommen, daß Neuronen im Rückenmark durch einen noch unbekannten Mechanismus gehemmt werden (Johnston et al., 1974). Die Dauer der Paralysezeit läßt sich als in vivo Indikator für das Ausmaß der Induktion Cytochrom P-450-abhängiger Isoenzyme in Mikrosomen durch Methylcholanthren verwenden.

Burns et al. (1958), die den Zoxazolaminabbau beim Menschen untersuchten, fanden nur 1 % des verabreichten Zoxazolamins unverändert im Urin wieder, der Rest wurde vollständig metabolisiert.

Dem Metaboliten Chlorzoxazon wird die paralysierende Wirkung zugeschrieben. Er erscheint unverändert im Urin. Der im Urin ausgeschiedene Hauptmetabolit ist Hydroxyzoxazolamin, das an Glucuronsäure gekoppelt ist. Beim Hydroxyzoxazolamin ist eine Hydroxylgruppe an den Benzolring angefügt, wogegen beim Chlorzoxazon die Aminogruppe des Zoxazolamins durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist. Man geht davon aus, daß es nach Induktion mit Methylcholanthren in vivo zu einer verstärkten Bildung von Hydroxyzoxazolamin auf Kosten der zum Chlorzoxazon führenden N-Hydroxylierung kommt.

1.1.4. Wirkungen von einigen Schwermetallen auf mikrosomale Enzyme und den Hämstoffwechsel

Der Einfluß von Schwermetallen auf die mischfunktionelle Oxidase ist seit längerer Zeit bekannt. Im folgenden sollen insbesondere diejenigen Aktivitäten, die in unmittelbarem Zusammenhang mit den von mir untersuchten Parametern (s. Fragestellung 1.2.) stehen, erwähnt werden.

1.1.4.1. Cadmium

Einmalige intraperitoneale Injektionen von Cd in einer Dosierung von o,84 - 2,3 mg/kg Körpergewicht bewirken nach 72 Stunden eine Verlängerung der Hexobarbitalschlafzeit- und Zoxazolaminparalysezeit bei männlichen Ratten um 85 - 155 %. Parallel dazu wird eine Abnahme der spezifischen Aminopyrindemethylase- und Anilin-4-Hydroxylaseaktivität und des Cytochrom P-450-Gehaltes beobachtet. Die Hämoxygenaseaktivität wird bis auf 350 % gesteigert (Johnston et al., 1974; Krasny et al., 1977; Teare et al., 1977).

Yoshida et al. (1976) berichten, daß diese Cd-bedingten Veränderungen dosisabhängig sind, 48 Stunden nach der Cd-Gabe (o,6 - 3 mg/kg i.p.) ihr Maximum erreichen und bei männlichen Mäusen ausgeprägter sind als bei weiblichen. Nach Roberts et al. (1976) beeinflussen intraperitoneale Injektionen von o,21 oder o,42 mg/kg Cd die mischfunktionelle Oxidase noch nicht, verhindern aber - 72 Stunden vor einer Dosis von o,84 mg Cd/kg injiziert - die oben beschriebenen Effekte.

Die Befunde nach chronischer Cd-Verabreichung sind widersprüchlich und unterscheiden sich teilweise von denen im akuten Versuch. So berichten Schnell et al. (1978) von unveränderten Schlafzeiten und Enzymaktivitäten bei männlichen Ratten nach chronischer Cd-Verabreichung (Cd-Verabreichung im Trinkwasser in Konzentrationen von 100 oder 200 mg/l über 2 - 12 Wochen bzw. 5 oder 20 mg/l über 50 Wochen).

Andererseits wurde eine Verstärkung des induzierenden Effektes von Phenobarbital durch Cd beobachtet. Dabei wurde Cd intraperitoneal 20 Tage lang in Dosierungen von 0,1 bzw. o,3 mg/kg x Tag verabreicht (Dieter et al., 1979). Hietanen (1978) fand bei männlichen Ratten nach Verabreichung von 440 mg $CdCl_2$/l Trinkwasser über 8 Wochen eine Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehalts und eine Induktion der Aryl-Kohlenwasserstoff Hydroxylase-Aktivität in der Leber. Die Gesamtcadmiumdosis war in diesen Versuchen allerdings höher als bei den akuten Versuchen, in denen Schlafzeit und Stoffwechsel verlängert bzw. verlangsamt waren.

1.1.4.2. Blei

Einmalige Bleibelastungen - in Dosierungen von 1,86 bis 41 mg Pb/kg Körpergewicht parenteral verabreicht - hemmen bei männlichen Ratten die Hydroxylierung von Hexobarbital und Zoxazolamin sowie die Aktivität der NADPH-Cytochrom c bzw. P-450 Reduktase. Außerdem nimmt die spezifische Anilinhydroxylase- und Äthylmorphin-N-Demethylaseaktivität und der Cytochrom P-450-Gehalt ab. Mit zunehmender Bleibelastung vermindert sich die Hämsynthese. Bekannt sind die Hemmung der δ-ALA-Dehydrogenase, der Koproporphyrinogenoxidase und der Ferrochelatase. Parallel dazu kommt es zu einem starken Anstieg der Hämoxygenase. (Alvares et al., 1972; Chow and Chornish, 1978; Goldberg, 1978).

1.1.4.3. Kupfer

Kupferdefizit in der Diät von Ratten führt in vitro zu einer Abnahme der Hexobarbitaloxidation durch Cytochrom P-450. In vivo wird eine entsprechende Verlängerung der Hexobarbitalschlafzeit beobachtet. Als mögliche Erklärung hierfür wird eine Katalysatorfunktion des Kupfers bei Cytochrom P-450-abhängigen Hydroxylierungendiskutiert (Wahle et al., 1977).

Yamane et al. (1978) berichten über den Einfluß kupferreicher Diät auf Rattenlebermikrosomen. Es wurde mit zunehmendem mikrosomalen Kupfergehalt ein Anstieg der Azoreduktaseaktivität beobachtet. Parallel dazu nahm der mikrosomale Riboflavingehalt zu. Möglicherweise können - wenn der durch Kupfer vermehrte Riboflavingehalt der Lebermikrosomen die Aktivität der Azoreduktase erhöht - auch andere mikrosomale Enzymaktivitäten auf diese Weise gesteigert werden.

1.1.4.4. Zink

Chiculescu und Onicescu (1974) fanden bei Ratten eine Verstärkung der Phenobarbitalinduktion nach zinkreicher Diät. Hierbei wurden die Tiere vor der Phenobarbitalinduktion 7 Tage lang täglich mit 100 mg bzw. 220 mg/kg Körpergewicht Zinksulfat gefüttert.

Zink in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht bewirkt bei Ratten keine Veränderung mikrosomaler Enzymaktivitäten oder von Schlafzeiten. Zweimalige

intraperitoneale Injektionen von 2 mg Zn/kg vor Cadmiumexposition können jedoch cadmiuminduzierte Stoffwechselveränderungen verhindern (Early and Schnell, 1978).

1.1.5. Metallothionein und dessen Wechselwirkungen mit einigen Schwermetallen

Metallothionein ist ein Protein mit hohem Schwefelgehalt (ca. 30 % Cystein) und einem Molekulargewicht von ca. 7000.
Cadmium, Zink, Kupfer und Quecksilber können die Bildung dieses Proteins induzieren, Blei nicht (Nordberg et al., 1971). Die genannten Schwermetalle binden an dieses Protein mit unterschiedlicher Festigkeit, womit sich seine entgiftende Wirkung in Zellkulturen erklären läßt. Der Induktion von Metallothionein geht eine verstärkte Synthese von zugehöriger mRNA voraus. Hemmversuche mit Actinomycin D zeigten, daß die Metallothioneinsynthese auf der Transskriptionsebene kontrolliert wird (Webb, 1979). Neben seiner Entgiftungsfunktion schreibt man dem Metallothionein auch eine steuernde Rolle für den Metabolismus essentieller Kupfer- und Zinkionen zu (Webb, 1979).

Nordberg et al. (1975) vermuten einen Schutzeffekt des Metallothioneins bei akuter Belastung mit Cadmium, demgegenüber jedoch bei chronischer Cadmiumbelastung eine Metallothioneinbeteiligung bei der Entwicklung von Nierenschäden. Wahrscheinlich ist Metallothionein - das von manchen Autoren als das Transportprotein für Cadmium im Organismus angesehen wird - bei chronischer Exposition letztlich für die bedrohliche Cadmiumakkumulation in der Nierenrinde verantwortlich (Fridberg et al., 1979). Erstes Zeichen einer sich entwickelnden Nierenschädigung ist eine β_2-Mikroglobulinurie als Folge der durch Cd gestörten Rückresorptionsfunktion in den proximalen Nierentubuli.

Zink- oder Cadmiumexposition vor einer höher dosierten, akuten Cadmiumbehandlung kann die toxischen Effekte dieser Behandlung verhindern oder stark mildern (Early und Schnell, 1978; Roberts et al., 1976). Als Erklärung dient die beobachtete Induktion der Metallothioneinsynthese in der Leber durch Zink oder Cadmium und eine Festlegung des Cadmiums durch dieses Protein. 98 % des Gesamtcadmiums der Leber sind nach chronischer Cadmiumexposition von Ratten an Metallothionein gebunden (Irons und Smith, 1976).

1.1.6. Schwermetalle und deren Aufnahme, Anreicherung und Bedeutung im menschlichen Organismus

1.1.6.1. Cadmium

Cd kommt als Mineral zusammen mit Zink vor und ist diesem chemisch sehr ähnlich. Es wird meist als Nebenprodukt bei der Verhüttung von Zink, häufig auch von Blei oder Kupfererzen gewonnen und in der Metall- und Kunststoffindustrie vielseitig verwendet (Cumbrowski, 1976; Friberg et al., 1979).

Die Cadmiumbelastung des Menschen ist bei einer extrem langen biologischen Halbwertzeit von 10 - 30 Jahren und ausgeprägter Akkumulationsfähigkeit in Leber und Niere sehr groß. Der erwachsene Mensch im Alter von 50 Jahren weist eine Gesamtkörperlast an Cd von 10 - 30 mg auf, davon allein 1/3 in der Niere, wobei sich der größte Teil in der Nierenrinde befindet. Die durchschnittliche in der Bundesrepublik Deutschland mit der Nahrung aufgenommene Cadmiummenge beträgt 30 - 60 µg pro Tag, wobei ca. 6 % resorbiert und aufgenommen werden (Umweltbundesamt, 1977). Die Hauptaufnahmequelle für Cd stellt die orale Zufuhr dar, während die pulmonale Resorption nur eine geringe Rolle spielt.

1.1.6.2. Blei

Pb kommt in weitaus größerem Umfang in Luft, Wasser und Boden vor als Cd und ist wie dieses kein essentielles Spurenelement. Das Hauptgewicht bei der industriellen Verwendung von Pb liegt in der Herstellung von Akkumulatoren, Rostschutz- und Antiklopfmitteln. Weiterhin benutzt man es als Bleiglätte, Bestandteil von Farben und Stabilisator von Kunststoffen (Bleistereaten).

Bei der Berechnung der biologischen Halbwertszeit von Pb ergibt sich eine komplizierte Kinetik, weil mindestens zwischen 2 Hauptkompartimenten mit unterschiedlichen Halbwertszeiten differenziert werden muß. In den Knochen, die ca. 90 % der Gesamtkörperlast speichern, rechnet man mit einer Halbwertzeit von 20 Jahren, während sie im Blut und in Weichteilgeweben 20 Tage beträgt (Friberg et al., 1979). Die Gesamtkörperlast an Pb wird für

den erwachsenen Menschen auf durchschnittlich 120 mg geschätzt bei einer täglichen durchschnittlich mit der Nahrung zugeführten Bleimenge von 300 µg (Umweltbundesamt 1976).

1.1.6.3. Kupfer

Cu wird wegen seiner besonderen physikochemischen Eigenschaften besonders in der Elektroindustrie verwendet, aber auch zur Herstellung von Metallegierungen wie Münzen, Blechen und Bronzen.

Es ist als essentielles Spurenelement unter anderem Bestandteil oxidativer Enzyme wie Katalasen, Peroxidasen und der Cytochromoxidasen und spielt bei der Hämoglobinbildung eine wichtige Rolle. Die tägliche Kupferzufuhr mit der Nahrung beträgt durchschnittlich 1 - 3 mg, wovon ca. 50 % resorbiert werden. Die biologische Halbwertzeit beträgt für den Menschen etwa 4 Wochen (Friberg et al., 1979), bei einer Gesamtkörperlast von ca. 80 mg (Cartwrigth und Wintrobe, 1964).

1.1.6.4. Zink

Zn findet in größerem Umfang Verwendung als Korrosionsschutzauflage. Weiterhin benutzt man es zum Galvanisieren und in Verbindung mit Kupfer als Messing auf verschiedene Art und Weise.

Es kommt als essentielles Spurenelement in Metalloenzymen wie der Carboanhydrase und der alkalischen Phosphatase vor; ferner in Hexokinasen, Peptidasen und Dehydrogenasen. Außerdem ist Zn Bestandteil der DNA-Polymerase und verschiedener RNA-Polymerasen und spielt folglich bei der Zellteilung und Proteinbiosynthese eine wichtige Rolle. Man schätzt den durchschnittlichen Zinkbedarf des Menschen auf 15 mg/Tag (Food and Nutrition Board, 1974), was in etwa auch der durchschnittlich täglich aufgenommenen Zinkmenge entspricht (Halsted et al., 1974).

Im Tierversuch wird je nach Bedarf zwischen 10 und 90 % des aufgenommenen Zinks vom Organismus resorbiert, wobei wohl im Darm - wie auch beim Eisen - ein Regulationsmechanismus existiert. Niedriges Körper-

gewicht und Zinkmangel erhöhen die Resorption, während hohe orale Zinkdosen und mit Zn interferierende Substanzen, wie z.B. Calcium, die Resorption sinken lassen (Becker und Hoekstra, 1971). Die Gesamtkörperlast an Zn beträgt ca. 2 g, wobei man beim Menschen von einer biologischen Halbwertzeit von etwa 1 Jahr ausgeht (Friberg et al., 1979). Bruch et al. (1975) berichten über Wachstums- und Wundheilungsstörungen sowie über Störungen der Sexualreifung bei Zinkdefizit.

1.2. Fragestellung

Ein toxikologischer Aspekt für die Beurteilung der Wirkung der genannten Schwermetalle, der bisher kaum beachtet wurde, könnte in ihrer Wechselwirkung mit Induktoren der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase liegen. Möglicherweise ist die Beeinflussung der Induzierbarkeit dieses Enzymsystems ein besonders empfindliches Kriterium für die Wirkung toxischer Metalle überhaupt.

Meine Untersuchungen beschränken sich auf die Ermittlung subakuter Metallwirkungen auf das mikrosomale Enzymsystem nach parenteraler Verabreichung. Dabei wurde unterschieden zwischen den Wirkungen der genannten Schwermetalle auf die Induktion durch Methylcholanthren einerseits und Phenobarbital andererseits.

Als in vivo meßbares Kriterium dienen für Phenobarbitalinduktion Hexobarbitalschlafzeiten und für Methylcholanthreninduktion Zoxazolaminparalysezeiten. Für meine Versuche wählte ich die Schwermetalle Cd, Pb, Cu und Zn.

Cd bzw. Pb verabreichte ich in einer Gesamtdosis (0,9 mg Cd/kg Körpergewicht bzw. 1,8 mg Pb/kg Körpergewicht), die bei anderen Autoren im akuten Versuch Stoffwechselveränderungen bewirkt hatte (s. 1.1.4.1 bzw. 1.1.4.2). Für Cu und Zn existieren keine derartigen Angaben. Deshalb wählte ich nach Vorversuchen Dosierungen, die zwar noch keine beobachtbaren toxischen Veränderungen an den Tieren hervorriefen, die jedoch einen Einfluß auf Schlaf- und Paralysezeiten hatten.

Um die Veränderungen der Hexobarbitalschlaf- oder Zoxazolaminparalysezeiten besser beurteilen zu können, wurde außerdem in einigen Versuchsreihen die in vitro-Aktivität ausgewählter Cytochrom P-450-abhängiger Aktivitäten bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

α-NF	=	alpha-Naphtoflavon
Cd	=	Cadmium
Cu	=	Kupfer
DCPIP	=	Dichlorphenol-indophenol
4-DMAB	=	4-Dimethylamino-azobenzol
MC	=	2-Methylcholanthren
MFO	=	mischfunktionelle Oxidase
MP	=	Metyrapon
NADH	=	Nicotinamidadenin-Dinucleotid (reduziert)
NADPH	=	Nicotinamidadenin-Dinucleotidphosphat (reduziert)
Pb	=	Blei
PB	=	Phenobarbital
Tris-HCL	=	Tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
Zn	=	Zink
Zoxazolamin	=	2-Amino-5-Chlorbenzoxazol

2.2. Chemikalien

Tab.: 1

Substanz	Reinheitsgrad	Katalognr.	Herkunft
7-Äthoxycumarin		19564-2	Aldrich-Chemi, Europe Berse, Belgien
alpha-Naphtoflavon	reinst	29978	Serva, Heidelberg
Biphenyl	zur Analyse	15o7o	Serva, Heidelberg
$CdCl_2 \times H_2O$	rein	2o11	Merck-AG., Darmstadt
$CuCl_2 \times 2H_2O$	zur Analyse	2733	Merck-AG., Darmstadt
Dichlorphenol-indophenol	zur Analyse	19354	Serva, Heidelberg
4-Dimethylamino-azobenzol	zur Analyse	11,449-9	EGA, Berlin
Glucose-6-Phosphat		127647	Boehringer, Mannheim
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase		127671	Boehringer, Mannheim
Hexobarbital (Evipan-Na (R))			Bayer, Leverkusen
2-u. 4-Hydroxybiphenyl*)	97 %	826-3; 13,434-1	EGA, Berlin
3-Methylcholanthren	practical grade	M-65o1	Sigma, St.Louis, USA
Metyrapon			EGA, Berlin
Nicotinamidadenin-Dinucleotid (reduziert)	Grad I	1o7735	Boehringer, Mannheim
Nicotinamidadenin-Dinucleotidphosphat (reduziert)	Grad II	1o7824	Boehringer, Mannheim
$PbCl_2$	trocken, zur Synthese	8o7383	Merck-Schuchardt, München
Phenobarbital		DAB: 6,B.P. 195 B	Merck-AG., Darmstadt
$ZnCl_2$	trocken, zur Analyse	8816	Merck-AG., Darmstadt
Zoxazolamin*)	99 %	A4, 58o-7	EGA-Chemie, Steinbach Albuch

*) 2-und 4-Hydroxybiphenyl wurden vor Gebrauch zweimal aus Benzol, Zoxazolamin dreimal aus n-Heptan umkristallisiert.

2.3. Tiermaterial, Applikationsweg

Als Versuchstiere dienten männliche Mäuse (NMRI-Hannover) mit einem Körpergewicht um 40 g (Extremwerte 35 bzw. 45 g).

Je 10 Tiere wurden zusammen in Makrolonkäfigen (15 cm x 32 cm x 26,5 cm) gehalten. Futter (Altromin-Standarddiät) und entmineralisiertes Wasser erhielten sie nach Bedarf. Die Verabreichung der verschiedenen Substanzen erfolgte durch intraperitoneale Injektionen.

2.4. Messung der Schlaf- und Paralysezeiten

2.4.1. Versuchsaufbau

In je vier Versuchsreihen wurden die Hexobarbitalschlaf- bzw. die Zoxazolaminparalysezeiten von Mäusen nach Behandlung mit $CdCl_2$, $ZnCl_2$, $PbCl_2$ oder $CuCl_2$ gemessen (im folgenden Schlafzeit gleich Hexobarbitalschlafzeit und Paralysezeit gleich Zoxazolaminparalysezeit). Als beendet galt die Schlaf- oder Paralysezeit dann, wenn sich das Versuchstier selbständig vom Rücken auf den Bauch drehte.

Eine Versuchsreihe (s. Tab. 2) setzte sich aus drei Gruppen mit je 20 Tieren zusammen. Je zehn der zwanzig Tiere jeder Gruppe erhielten anstelle der Schwermetallverbindungen 0,9 % NaCl injiziert und dienten als Kontrolltiere (Gruppe 1b, 2b 3b). Gruppe 1a erhielt das Schwermetall, Gruppe 2a Schwermetall und Phenobarbital, Gruppe 3a Schwermetall und Methylcholanthren.

Tab.: 2

Versuchsanordnung (Erläuterungen s.o.)

Aufbau einer Versuchsreihe

Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
a	b	a	b	a	b
(n = 10) Schwermetall	(n = 10) 0,9 % NaCl	(n = 10) Schwermetall + PB	(n = 10) 0,9 % NaCl + PB	(n = 10) Schwermetall + MC	(n = 10) 0,9 % NaCl + MC

2.4.2. Lösungsmittel und Dosierung

Lösungsmittel war für die Schwermetallsalze sowie Pheno- und Hexobarbital 0,9 % NaCl, für Methylcholanthren Maisöl. Zoxazolamin wurde in möglichst wenig 0,1 n HCl gelöst und dann mit Aqua dest. zum Endvolumen aufgefüllt. Pro 100 Gramm Tiergewicht wurde 1 ml Lösung i.p. injiziert, bei Zoxazolamin wegen geringerer Löslichkeit 2 ml/100 Gramm.

Tab.: 3 Dosierungsschema

Substanz	Dosis	Konzentration der Injektionslösung
$CdCl_2$	o,3 mg Cd/kg	o,o3 mg/ml
$ZnCl_2$	9 mg Zn/kg	o,9 mg/ml
$PbCl_2$	o,6 mg Pb/kg	o,o6 mg/ml
$CuCl_2$	1 mg Cu/kg	o,1 mg/ml
PB	50 mg/kg	5 mg/ml
MC	10 mg/kg	1 mg/ml
Hexobarbital	75 mg/kg	7,5 mg/ml
Zoxazolamin	100 mg/kg	5 mg/ml

2.4.3. Zeitlicher Ablauf der Versuche

An drei aufeinanderfolgenden Tagen erhielt jeweils eine Gruppe das Schwermetall, das Schwermetall mit PB oder Schwermetall mit MC injiziert. Die Kontrolltiere bekamen zeitlich genau parallel anstelle des Schwermetalls 0,9 % NaCl. Am 4. Tag wurde die Schlaf- und Paralysezeit gemessen. Die Injektionen und die Messung der Schlaf- oder Paralysezeiten erfolgten immer zur gleichen Uhrzeit (Injektion um 17.3o Uhr, Messung der Schlaf- oder Paralysezeiten um 7.3o Uhr).

2.4.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney für zwei unabhängige Stichproben (L.Sachs,1973). Bei den Versuchen mit Streuungen über 40 % wurde die kürzeste und längste Schlaf- oder Paralysezeit weggelassen und Mittelwert, Streuung und U-Test ohne diese Werte errechnet.

2.5. Biochemische Bestimmungen

2.5.1. Behandlung der Tiere

Je 6 Mäusen (im Anhang Tab. 8 ff, Gruppen 7 - 12) wurde die Kombination $CdCl_2$/MC oder $CuCl_2$/MC oder $ZnCl_2$/MC (Dosierung s. Tab. 3) injiziert. Je 6 weitere Versuchstiere, die 0,9 % NaCl und MC erhielten, dienten bei jedem Versuch (im Anhang Tab. 8 ff, Gruppen 1 - 6) als Kontrollgruppen. Alle Versuche wurden zweimal durchgeführt, so daß insgesamt je 12 Tiere pro Metall- und Kontrollgruppe zur Auswertung herangezogen wurden.

Die Injektionen erfolgten an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr. Am dritten Tag wurde den Tieren nach der letzten Injektion das Futter entzogen. Am vierten Tag um 7.3o Uhr wurde jedes Tier mit Äthylurethan (2,5 g/kg Körpergewicht) anästhesiert, die Leber entnommen und mit eiskalter 0,9 % NaCl-Lösung perfundiert.

2.5.2. Präparation der Mikrosomen

Sämtliche Präparationsschritte wurden bei 0 - 5°C durchgeführt. Nach Zerkleinerung und Homogenisierung der perfundierten Leber in 4 Volumina eiskalter 150 mM KCl und 5,5 mM EDTA, pH 7.5, mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator (1 Minute; 6 Hübe bei 900 upm) wurde das Homogenat 10 min lang bei 9000 upm in einer Beckman J-21 B Zentrifuge mit einem JS-13 Rotor bei 8200 g zentrifugiert. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation des Überstandes bei 19000 g (17000 upm) in einer Beckman LH-50 Ultrazentrifuge mit einem Ti-50 Rotor und eine weitere 6o-minütige Zentrifugation des erhaltenen Überstandes mit gleichem Apparat und Rotor bei 105000 g.

Die gewonnenen Mikrosomen - ungefähr 20 mg Protein pro Leber - wurden 3 mal mit 5 ml 150 mM KCl, pH 7.5, oberflächlich gespült, in 5 ml der gleichen Lösung (8 Hübe/45 sec.) homogenisiert und die Suspension innerhalb von 3 Stunden für Reaktionsgemische und Cytochrommessungen benutzt.

2.5.3. Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) modifiziert nach Hartree (1972), durchgeführt.

2.5.4. Messungen von Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 nach der Methode von Omura und Sato (1964a)

Nach geeigneter Verdünnung der Mikrosomen in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4, wurde Cytochrom P-450 durch Messung des mit $Na_2S_2O_4$ reduzierten Kohlenmonoxid-Differenzspektrums zwischen 490 und 450 nm ($\Delta\varepsilon_{450-490\ nm} = 91\ cm^2 \times Mol^{-1}$), b_5 durch Messung des mit NADH-reduzierten Differenzspektrums zwischen 424 und 409 nm ($\Delta\varepsilon_{409\ -\ 424} = 185\ cm^2 \times \mu Mol^{-1}$) bestimmt. Die Messungen erfolgten mit einem Perkin-Elmer Spektralphotometer (Modell 555).

2.5.5. Enzymatische Bestimmungen

2.5.5.1. Glucose-6-Phosphatase

Nach der Methode von Baginski et al. (197o) wurde die pro Zeiteinheit von der Glucose-6-Phosphatase aus Glucose-6-Phosphat freigesetzte Menge anorganischen Phosphats als Phosphat-Molybdatkomplex bei 700 nm gemessen. Meßgerät war ein Beckman Spektralphotometer (Modell 25).

2.5.5.2. DCPIP-Reduktase

Maß für die NADPH-abhängige mikrosomale Reduktaseaktivität war die Abnahme der Absorption von DCPIP bei 600 nm nach der Methode von Masters et al. (1967); gemessen wurde mit einem Beckman Spektralphotometer (Modell 25). Die Geschwindigkeit der DCPIP-Reduktion wird in der Literatur allgemein als Maß für die Aktivität der Cytochrom P-450 Reduktase verwendet.

2.5.5.3. N-Demethylierung

Als Substrat dienten Äthylmorphin bzw. 4-DMAB. Der bei der Substratdemethylierung gebildete Formaldehyd wurde nach Nash (1953) und Nebert et al. (1973) mit einem Perkin-Elmer Photometer (Modell 555) bei 412 nm gemessen.

1,01 ml Inkubationsgemisch, pH 7.4 enthielten:
50 mM Tris-HCl, pH 7.6
75 mM KCl
6 mM $MgCl_2$
5 mM Glucose-6-Phosphat
1 mM $NADP^+$

1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 0,01 ml und o,4 bis o,6 mg mikrosomales Protein (entsprechend 0,1 ml Mikrosomen-Suspension).

Substratkonzentration: 6 mM Äthylmorphin bzw. 2 mM 4-DMAB (letzteres in 0,o1 ml Äthanol). In den Leerwerten befanden sich durch Hitze (5 min bei 90°C) inaktivierte Mikrosomen.

2.5.5.4. O-Deäthylierung von 7-Äthoxycumarin

Die Bestimmung der O-Deäthylierung des 7-Äthoxycumarins zu 7-Hydroxycumarin erfolgte fluorometrisch bei 25°C. Der Test wurde nach der Methode von Ullrich und Weber (1972) mit einem Eppendorf Filterphotometer mit Fluoreszenzzusatz bei einer Anregungswellenlänge von 306 nm und einem Emissionsfilter von 400 nm durchgeführt.

Testansatz: 0,9 ml der 1 : 5 in 0,1 M Tris-HCl, pH 7.6, verdünnten Mikrosomensuspension
0,1 ml 1 mM Äthoxycumarin in 0,1 M Tris-HCl, pH 7.6

Nach 3 min Vorinkubation (Thermostatisierung) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 10 mM NADPH-Lösung gestartet, die Bildung des 7-Hydroxycumarin während 2 - 3 min fluorometrisch verfolgt und am Schreiber aufgezeichnet. Zu jedem Test wurden bei Meßzeitende genau 2 nMol 7-Hydroxycumarin (gelöst in 0,1 M Tris-HCl, pH 7.6) als innerer Standard zugegeben.

Weiter wurde in Mikrosomen aus Lebern von Zn- oder Cd-belasteten Mäusen bei simultaner Induktion mit MC die Hemmung der O-Deäthylierung durch

αNF (50 µM) und MP (100 µM) nach 6 min Vorinkubation und Start der Reaktion durch NADPH untersucht. Die Hemmung der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycumarin durch αNF oder MP wurde in % der Aktivität ohne Zusatz des Hemmstoffes angegeben.

Die Methanolkonzentration in dem Hemmtest war 0,3 M. Die Enzymhemmung durch Methanol, die ca. 40 % betrug, wurde nicht berücksichtigt, da sowohl in die Hemmtests der Kontrollgruppen als auch der Cd/MC- oder Zn/MC-behandelten Gruppen die gleiche Methanolkonzentration eingesetzt wurde.

2.5.5.5. Biphenyl-Hydroxylierung zu 2-OH-und 4-OH-Biphenyl

Die Bestimmung wurde nach der Methode von Burke (1975) modifiziert nach Johnson et al. (1979) durchgeführt.

1,15 ml Reaktionsgemisch enthielten:
1 ml reduzierendes System: (0,2 M Tris-HCl, pH 7.6; 0,1 M $MgCl_2$;
1 mM NADPH; 700 µM NADH; Albumin 0,7 mg/ml)
o,1 ml Mikrosomensuspension mit 0,4 - o,6 mg mikrosomalem Protein
o,o5 ml Substratlösung (50 µM Biphenyl in Methanol).

Nach 10 min Inkubation bei 37°C im abgedunkelten Schüttelwasserbad erfolgte der Stop der Reaktion mit eisgekühlter 2N HCl und Extraktion von Biphenyl und seiner Metaboliten mit 4 ml n-Heptan. Nach Extraktion eines 2,5 ml Aliquots der organischen Phase mit 4 ml 0,1 N NaOH und vollständigem Absaugen des n-Heptans wurden 0,5 ml 0,5 N Bernsteinsäure zugegeben und 15 min bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen Bernsteinsäure und hydroxylierten Biphenylen gewartet.

Mit einem Jobin-Spektralfluorimeter (J-Y-3) erfolgte die Fluoreszenzmessung des 2-OH-Biphenyls bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm und einer Emissionswellenlänge von 415 nm und des 4-OH-Biphenyls bei einer Anregungswellenlänge von 275 und einer Emissionswellenlänge von 338 nm.

Über gleichbehandelte Standardproben wurden die Konzentrationen der gebildeten Metabolite ermittelt.

Berechnung:

$$B_k = \frac{B - f_a \times A}{1 - f_a \times f_b} \qquad A_k = \frac{A - f_b \times B}{1 - f_a \times f_b}$$

B steht für die Fluoreszenz der Proben unter 2-OH-Bedingungen.

A steht für die Fluoreszenz der Proben unter 4-OH-Bedingungen.

$$f_a = \frac{\text{Fluoreszenz des 4-OH-Standards unter 2-OH-Bedingungen}}{\text{Fluoreszenz des 4-OH Standards unter 4-OH-Bedingungen}}$$

$$f_b = \frac{\text{Fluoreszenz des 2-OH-Standards unter 4-OH-Bedingungen}}{\text{Fluoreszenz des 2-OH-Standards unter 2-OH-Bedingungen}}$$

Die korrigierten Werte A_k und B_k liefern nach Vergleich mit den Standards die gesuchte Menge Produkt.

2.5.6. Statistik

Die Berechnung von Mittelwert und Streuung erfolgte durch den Student-t-Test für kleine Stichproben mit einem Hewlett-Packard-Calculator (Modell 9821 A).

3. Ergebnisse

3.1. Schlaf- und Paralysezeiten

Aus Gründen der starken Variabilität zwischen den einzelnen Versuchstagen wurden die Schlaf- und Paralysezeiten der mit Schwermetall belasteten Tiere stets mit denen der zeitlich parallel behandelten Kontrolltiere (0,9 % NaCl) verglichen (Zahlenwerte s. auch Anhang, Tab. 4, 5, 6, 7).

3.1.1. Schwermetallgabe ohne Induktor

3.1.1.1. Hexobarbitalschlafzeiten

Nach Cd (0,3 mg/kg x Tag) und Zn (9 mg/kg x Tag) über 3 Tage waren die Hexobarbitalschlafzeiten gegenüber den Kontrolltieren signifikant verlängert. Die mit Cd behandelten Tiere schliefen im Durchschnitt 11 min länger als die Kontrolltiere ($p \leq 0{,}02$). Ausgeprägter war der Befund bei den Zn belasteten Tieren, die im Mittel 51 min länger schliefen, entsprechend einer Verlängerung der Schlafzeiten um 200 % gegenüber der Kontrollgruppe ($p \leq 0{,}01$) (s. Abb. 1, S. 22).

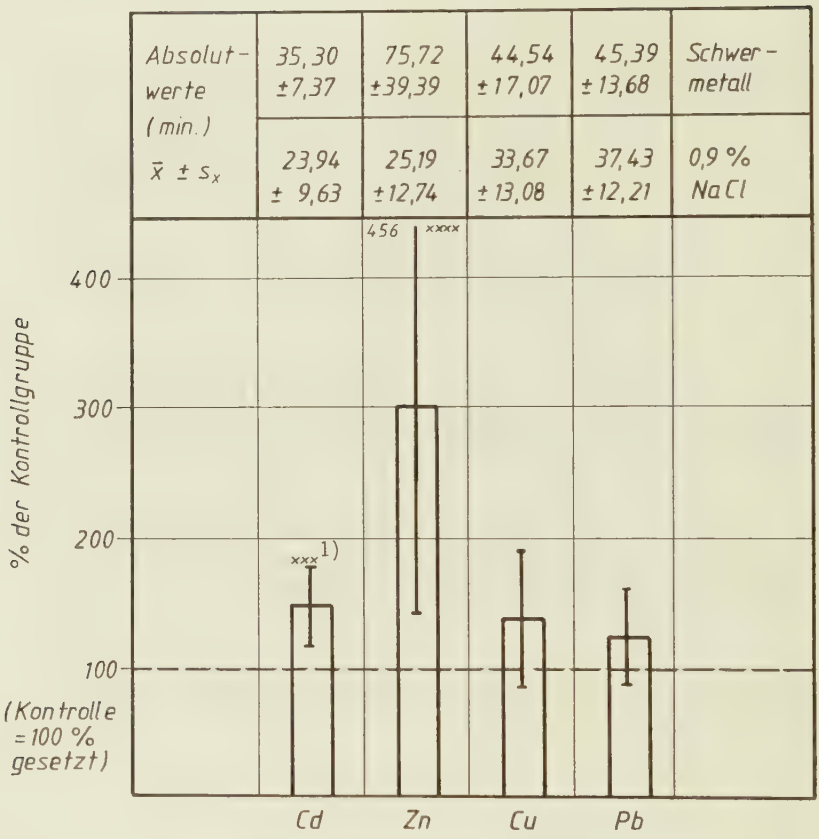
Demgegenüber zeigten sich nach 3-tägiger Cu- (1 mg/kg x Tag) und Pb- (3 x 0,6 mg/kg x Tag) Injektion keine signifikanten Veränderungen (s. Abb. 1, S. 22).

3.1.1.2. Zoxazolaminparalysezeiten

Die 3-tägige Belastung mit Zn (9 mg/kg x Tag) verlängerte auch die Zoxazolaminparalysezeit am stärksten. Der Effekt war jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Hexobarbitalschlafzeit. Die Paralysezeit war gegenüber den Kontrolltieren im Durchschnitt um 37 min verlängert, was einer Steigerung auf 239 % entspricht ($p \leq 0{,}01$) (s. Abb. 2, S. 23).

Die Verlängerung der Paralysezeiten nach Cd (0,3 mg/kg x Tag), Pb (0,6 mg/kg x Tag) oder Cu (1 mg/kg x Tag) war dagegen wesentlich schwächer ausgeprägt (Cd: + 45,4 %, $p \leq 0{,}05$; Pb: + 42,2 %, $p \leq 0{,}1$; Cu: + 40,4 %, n.s.). (Zahlenwerte siehe auch Anhang, Tab. 4, 5, 6, 7).

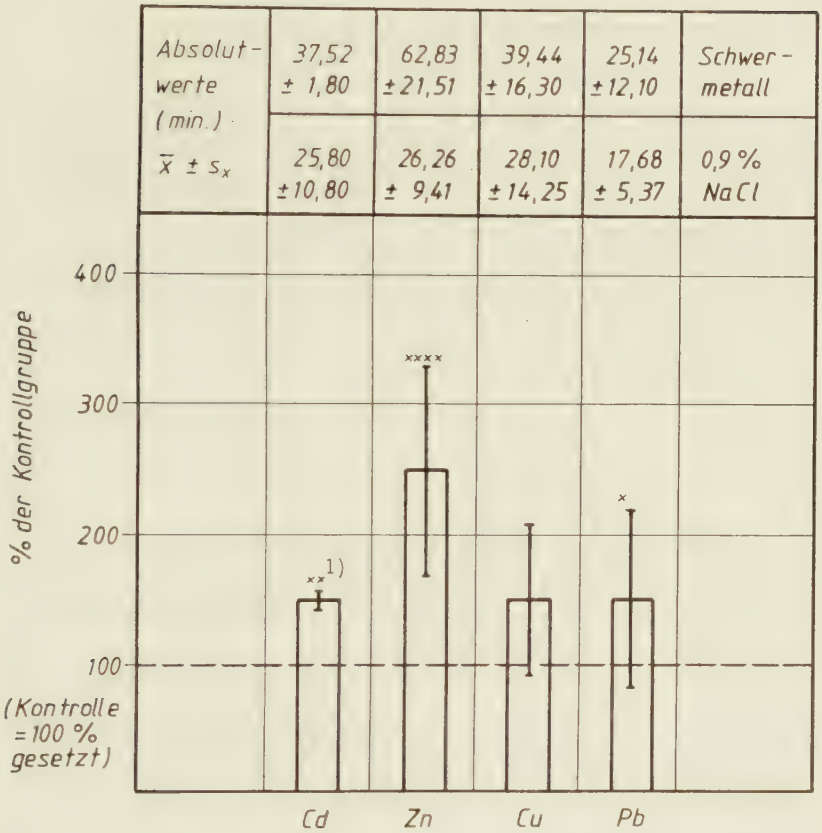
Abb. 1 Hexobarbitalschlafzeiten von Mäusen nach Behandlung mit Schwermetallen



Je 10 männliche NMRI-Mäuse wurden vom 1. - 3. Versuchstag um 17.3o Uhr ip. mit Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) behandelt.
Je 10 Kontrolltiere erhielten zeitlich parallel 0,9 % NaCl.
Messung der Schlafzeiten erfolgte am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (U-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.01$; * * * * * = $p \leq 0{,}002$

Abb. 2 Zoxazolaminparalysezeiten von Mäusen nach Behandlung mit Schwermetallen



Je 10 männliche NMRI-Mäuse wurden vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. mit Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) behandelt. Je 10 Kontrolltiere erhielten zeitlich parallel 0,9 % NaCl. Messung der Paralysezeiten erfolgte am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (U-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.01$; * * * * * = $p \leq 0.002$

3.1.2. Schwermetallgabe mit Induktor

3.1.2.1. Hexobarbitalschlafzeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit PB.

Nach Gabe von Cd (0,3 mg/kg x Tag) und simultaner Induktion mit PB (50 mg/kg x Tag) über 3 Tage war die Hexobarbitalschlafzeit gegenüber den Kontrollen (0,9 % NaCl/PB) um durchschnittlich 11 min leicht verkürzt (-44 %, $p \leqq 0,1$), während sie nach 3-tägiger Zn-Behandlung (9 mg/kg x Tag) und gleichzeitiger Induktion mit PB um durchschnittlich 10 min verlängert war (+ 65,7 %, $p \leqq 0,002$). Die Behandlung mit Cu (1 mg/kg x Tag) und PB oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und PB veränderte die Hexobarbitalschlafzeiten gegenüber den Kontrollgruppen dagegen nicht (s. Abb. 3, S. 25; s. Anhang Tab. 4, 5, 6, 7).

3.1.2.2. Zoxazolaminparalysezeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit PB

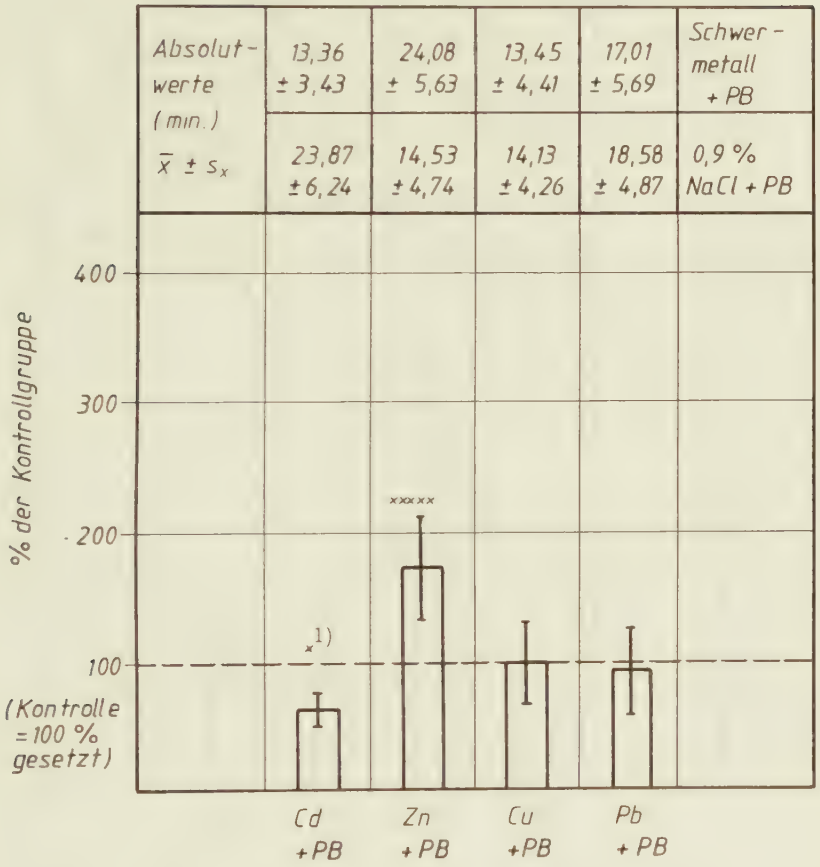
Gabe von Cd (0,3 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und simultane Induktion mit PB (50 mg/kg x Tag) über 3 Tage verursachte keine signifikanten Veränderungen der Zoxazolaminparalysezeiten im Vergleich zu den Kontrollgruppen (s. Abb. 4).

Lediglich die kombinierte, 3-tägige Behandlung mit Zn (9 mg/kg x Tag) und PB (50 mg/kg x Tag) bewirkte eine signifikante Verlängerung der Paralysezeit um 14 min (+ 71,1 %, $p \leqq 0,1$) (s. Abb. 4, S. 26).

3.1.2.3. Hexobarbitalschlafzeiten nach Schwermetallgabe und Induktion mit MC

Die Hexobarbitalschlafzeiten waren nach 3-tägiger Behandlung mit Cd (0,3 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und paralleler Verabreichung von MC (10 mg/kg x Tag) gegenüber den Werten der Kontrollgruppen fast unverändert. Im Gegensatz dazu verursachte Zn (9 mg/kg x Tag) in Kombination mit MC eine besonders ausgeprägte Verlängerung der Hexobarbitalschlafzeit (+ 79 min oder + 365,4 %, $p \leqq 0,002$) (s. Abb. 5, S. 27).

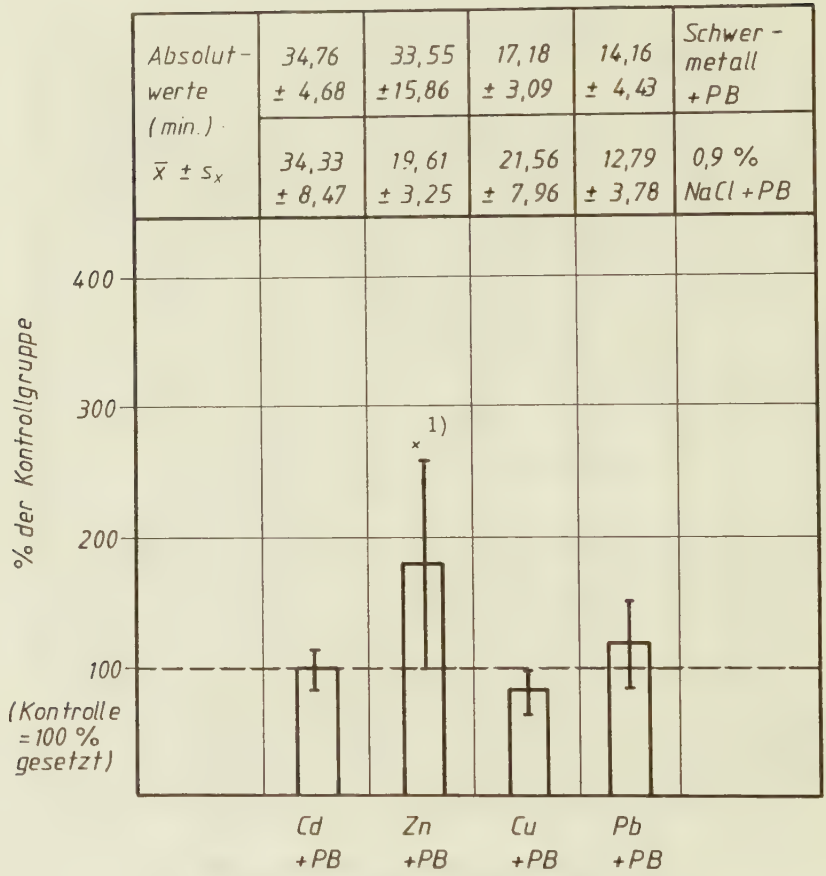
Abb. 3 Hexobarbitalschlafzeiten von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und PB



Je 10 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und PB (50 mg/kg x Tag).
Je 10 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls PB, anstelle des Metalls jedoch 0,9 %NaCl.
Messung der Schlafzeiten erfolgte am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (U-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.01$; * * * * * = $p \leq 0.002$

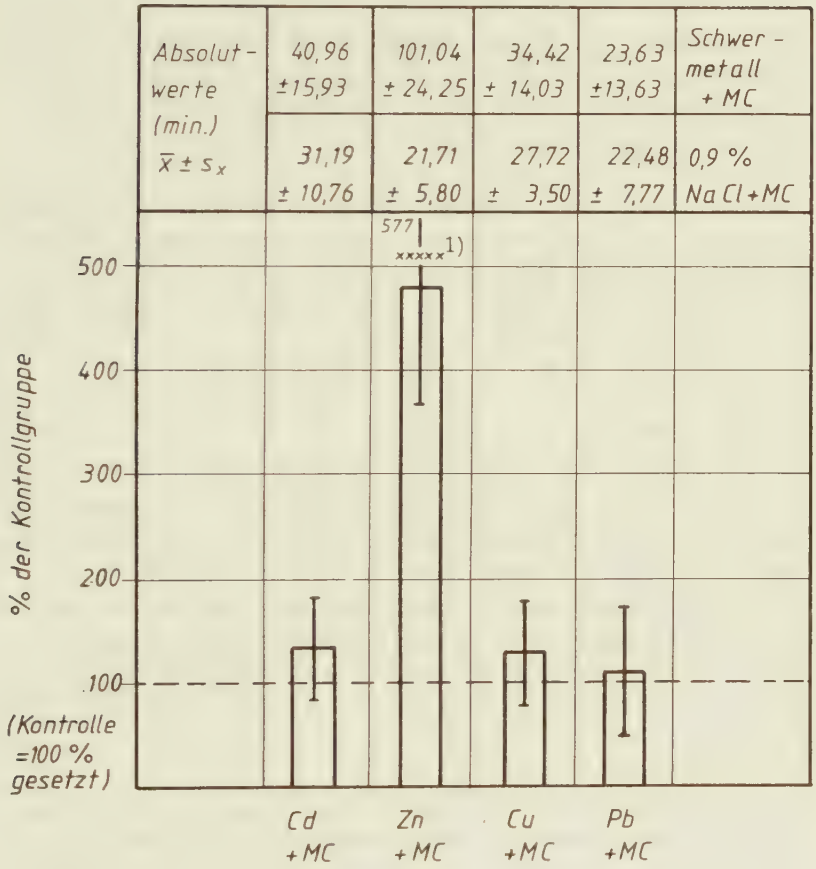
Abb. 4 Zoxazolaminparalysezeiten von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und PB



Je 10 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und PB (50 mg/kg x Tag).
Je 10 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls PB anstelle des Metalls jedoch 0,9 % NaCl.
Messung der Paralysezeiten erfolgte am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (U-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.01$; * * * * * = $p \leq 0.002$

Abb. 5 Hexobarbitalschlafzeiten von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und MC



Je 10 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und MC (10 mg/kg x Tag).
Je 10 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls MC, anstelle des Metalls jedoch 0,9 % NaCl.
Messung der Schlafzeiten erfolgte am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (U-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.01$; * * * * * = $p \leq 0.002$

3.1.2.4. Zoxazolaminparalysezeit nach Schwermetallgabe und Induktion mit MC

Nach Cd-Gabe (0,3 mg/kg x Tag) bzw. Zn-Gabe (9 mg/kg x Tag) über 3 Tage zeigte sich bei gleichzeitiger Induktion durch MC (10 mg/kg x Tag) eine signifikante Paralysezeitverlängerung um durchschnittlich 22 min (Cd: + 129 %, $p \leqq 0,02$) bzw. 53 min (Zn: + 229,7 %, $p \leqq 0,05$) (Abb. 6).

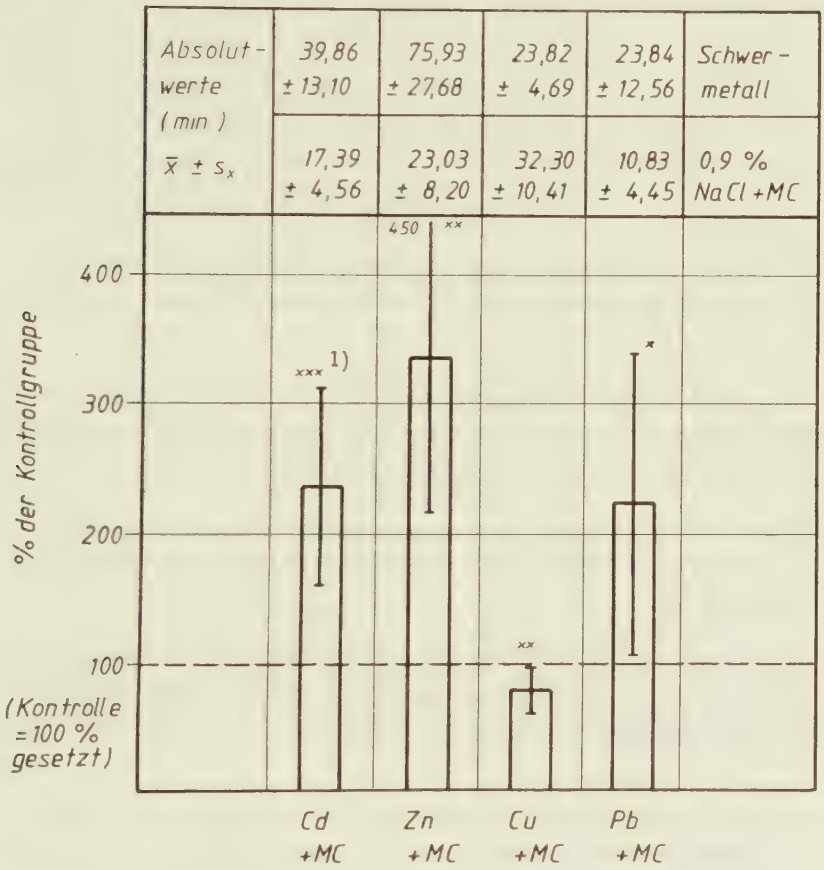
Dreitägige Induktion mit MC führte dagegen bei simultaner Cu-Injektion (1 mg/kg x Tag) zu einer signifikanten Verkürzung der Zoxazolaminparalysezeit um durchschnittlich 9 min (- 26,3 %, $p \leqq 0,05$), während sie nach Pb-Injektion (0,6 mg/kg x Tag) im Mittel um 14 min verlängert war (+ 12o,1 %, $p \leqq 0,2$) (Abb. 6, S. 29).

3.1.2.5. Übersicht

Bei der Interpretation der Ergebnisse von Schlaf- und Paralysezeiten ist jeweils nur der Vergleich zwischen den Befunden der Schwermetallbehandelten Tiere und denen der zeitlich genau parallel behandelten Kontrolltiere möglich. Dagegen können Befunde, die an verschiedenen Versuchstagen erhoben wurden, aufgrund der starken Variabilität der Werte zwischen den einzelnen Versuchstagen (eigene Vorversuche) und dem unterschiedlichen Alter der Versuchstiere (Altersunterschied mindestens 1 Woche) nicht miteinander verglichen werden (siehe auch Heubel et al., 1981).

Betrachtet man die nur mit Schwermetall ohne Induktor belasteten Tiere mit den parallel behandelten Kontrolltieren, die nur 0,9 % NaCl erhielten, so kann in allen Fällen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Schlaf- bzw. Paralysezeitverlängerung beobachtet werden. Dabei liegen die Veränderungen zwischen 21 und 200 %, wobei die eindrucksvollsten Effekte nach Zn-Exposition auftraten. Ein besonders auffälliges Beispiel war die Diskrepanz zwischen der Streuung der Paralysezeiten Cd-belasteter Tiere, die lediglich 4,8 % betrug, und der der parallel behandelten Kontrolltiere mit 41,9 %.

Abb. 6 Zoxazolaminparalysezeiten von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und MC



Je 10 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag), Cu (1 mg/kg x Tag) oder Pb (0,6 mg/kg x Tag) und MC (10 mg/kg x Tag). Je zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls MC, anstelle des Metalls jedoch 0,9 % NaCl.
Messung der Paralysezeiten erfolgte am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (U-Test):
* = $p \leq 0.2$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.01$; * * * * * = $p \leq 0.002$

Vergleicht man die simultan mit Schwermetall und PB behandelten Tiere mit den jeweiligen Kontrolltieren, so fällt die Verkürzung der Hexobarbitalschlafzeit nach Cd-Gabe auf (s. Abb. 3). Obwohl die Schlafzeitverkürzung gegenüber den Kontrolltieren nach simultaner Cd- und PB-Injektion nicht besonders ausgeprägt und zusätzlich die durchschnittliche Schlafzeit der Kontrolltiere relativ lang war, so ist es dennoch bemerkenswert, daß im Gegensatz zur Schlafzeitverlängerung nach alleiniger Cd-Gabe nach simultaner Cd- und PB-Verabreichung eine Schlafzeitverkürzung auftrat (s. Abb.1).

Lediglich nach Zn-Belastung mit kombinierter PB-Gabe zeigten sich Schlaf- bzw. Paralysezeitverlängerungen. Sie waren jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Behandlung ohne Induktor (+ 65,7 bzw. + 71,1 %, s. Abb. 3, 4).

Demgegenüber konnten die in allen übrigen Fällen nach alleiniger Schwermetallexposition beobachteten Schlaf- bzw. Paralysezeitverlängerungen bei simultaner PB-Injektion nicht mehr beobachtet werden.

Bei den Tieren, die neben den Schwermetallen MC injiziert bekamen, war die Verkürzung der Paralysezeit nach Cu/MC-Injektion der auffallendste Befund (s. Abb. 6).

Demgegenüber war die nach Zn-Exposition beobachtete Schlaf- bzw. Paralysezeitverlängerung gegenüber den parallel mit 0,9 % NaCl und MC behandelten Mäusen besonders ausgeprägt (+ 365,4 % bzw. + 229,7 %; s. Abb. 5, 6).

3.2. Relative Lebergewichte, mikrosomale Proteinausbeute und biochemische Ergebnisse

Um Anhaltspunkte zur Erklärung der beobachteten Schlaf- bzw. Paralysezeitveränderungen zu gewinnen, wurden eine Reihe von biochemischen Parametern bestimmt. Dabei wurden nur Kombinationen mit MC untersucht, weil die Befunde bei der simultanen Verabreichung von Zn/PB, Cu/PB und Pb/PB nicht so ausgeprägt waren und die Auswirkungen einer kombinierten Verabreichung von Cd/PB auf die MFO der Mausleber bereits Gegenstand früherer Untersuchungen dieses Instituts gewesen war (Dieter et al., 1979). Der

Einfluß einer simultanen Injektion von Pb und MC auf die biochemischen Parameter wurde ebenfalls nicht weiter untersucht, weil hier Schlaf- und Paralysezeiten nur geringfügig verändert waren.

An biochemischen Parametern wurden bestimmt:

- Die Aktivität der Äthylmorphin-Demethylierung, die als enzymatisch zuverlässiger Parameter für die Induktion phenobarbitaltypischer Cytochrome gilt (Conney, 1967) und die 4-DMAB-Demethylierung als Parameter für MC-induzierbare Cytochrome (Nebert et al., 1979).
- Die Aktivität der Äthoxycumarin-Deäthylierung als Parameter für sowohl durch PB-als auch MC-induzierbare Cytochrome in Ratten (Ullrich et al., 1973).
- Die Hydroxylierung von Biphenyl in 4-Stellung als Parameter für die Induktion PB-typischer Cytochrome (Burke, 1975).
- Die Hydroxylierung von Biphenyl in 2- oder 4-Stellung als Parameter für die Induktion MC-typischer Cytochrome (Nebert, 1979).
- Die Reduzierung von DCPIP anstelle der Reduzierung von Cytochrom P-450 (Masters et al., 1967).
- Die Glucose-6-Phosphatase als mikrosomales Leitenzym zur Kontrolle der Vergleichbarkeit der mikrosomalen Präparationen.

Weiterhin wurden relative Lebergewichte, mikrosomale Proteinausbeute sowie der mikrosomale Cytochrom P-450- und b_5-Gehalt gemessen.

3.2.1. Relative Lebergewichte (mg Leber/g Maus)

Das relative Lebergewicht war bei den mit Cd/MC oder Cu/MC belasteten Tieren gegenüber den Kontrollwerten (NaCl/MC) unverändert und betrug im Mittel 52,5 ($s_x = \pm 8,6$) bzw. 52,1 ($s_x = \pm 3,5$) mg Leber/g Maus. Durch Zn/MC-Vorbehandlung wurde das mittlere Lebergewicht auf 89,2 % der Kontrollen vermindert (Zn/MC 45,4 $\pm$ 3,9; Kontrolltiere 50,9 $\pm$ 3,1; $p \leqq 0,01$). Das Körpergewicht der Mäuse war in beiden Gruppen nicht signifikant verändert (s. Anhang Tab. 8, 9, 10).

3.2.2. Mikrosomale Proteinausbeute

Die Ausbeute an mikrosomalem Protein war nach Cd/MC- oder Cu/MC-Injektionen nicht signifikant verändert gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen (0,9 % NaCl/MC) und lag im Mittel bei 12,5 ($s_x = \pm 2,3$) bzw. 12,8 ($s_x = \pm 2,6$) mg Protein/g Leber. Nach Zn/MC-Belastung betrug die Proteinausbeute 13,1 ($s_x = \pm 1,7$) mg Protein/g Leber gegenüber 17,0 ($s_x = \pm 2,1$) mg/g Leber bei der Kontrolle ($p \leqq 0,001$). Diese Abnahme (77,1 % der Kontrolle) war ausgeprägter als bei den relativen Lebergewichten (89,2 % der Kontrolle) (s. Anhang Tab. 8, 9, 1o).

3.2.3. Cytochrome P-450 und b_5

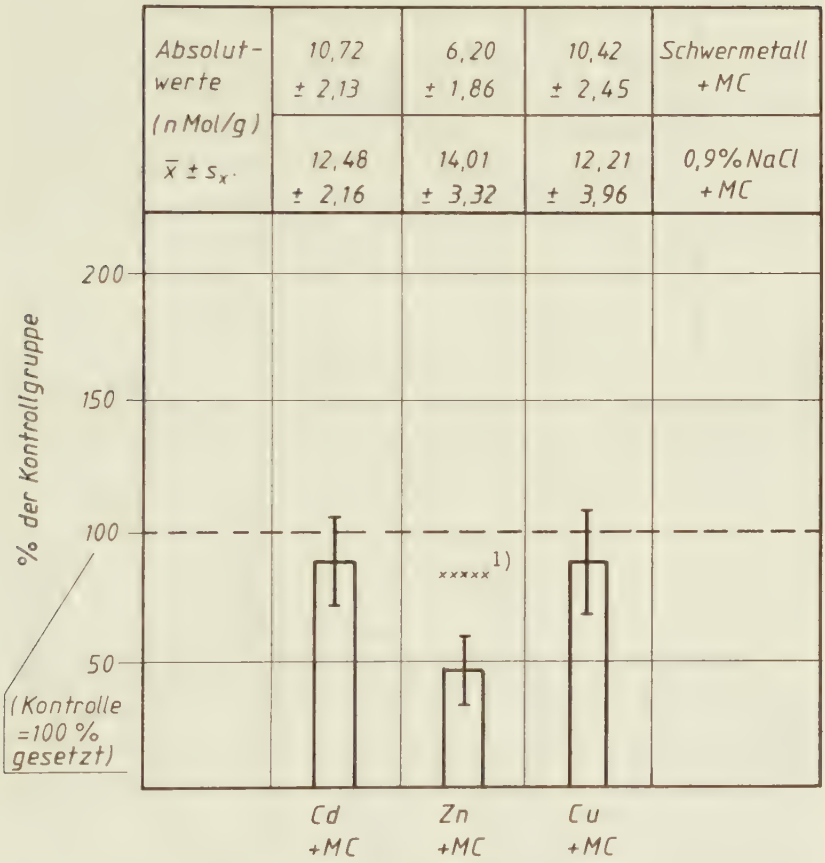
3.2.3.1. Cytochrom P-450

Nach Belastung mit Cd, Cu oder Zn in den angegebenen Dosierungen und Induktionen mit MC lag bei allen Tieren das Cytochrom P-450/g Leber niedriger als bei den Kontrolltieren, die lediglich 0,9 % NaCl und MC erhielten. Diese Abnahme war allerdings nicht signifikant nach Cd/MC-Belastung (Cd/MC 10,7; Kontrolle 12,5 nMol/g Leber) und nach Cu/MC-Belastung (Cu/MC 10,4; Kontrolle 12,2 nMol/g Leber). Demgegenüber zeigte sich eine signifikante Abnahme nach Zn/MC-Injektion ($p \leqq 0,001$). Das Cytochrom P-450 nahm im Mittel um 55,7 % von 14 nMol/g Leber auf 6,2 nMol/g Leber ab (s. Abb. 7, S.33). Ähnliche Befunde ergaben sich bei Bezug des Cytochrom P-450 auf mg Proteinausbeute (s. Anhang Tab. 8, 9, 1o).

3.2.3.2. Cytochrom b_5

Die Injektion von Cd/MC oder Cu/MC zeigte im Hinblick auf Cytochrom b_5 keine Wirkung. Der Cytochrom b_5-Gehalt war in den Kontrollgruppen, die 0,9 % NaCl und MC erhielten, und den mit Schwermetall und MC behandelten Gruppen nahezu gleich (s. Anhang Tab. 8, 1o) (s. Abb. 8, S. 34). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Belastung mit Zn und MC eine signifikante Abnahme der Cytochrom b_5-Konzentration. Sie sank von 5,2 nMol/g Leber um 59,6 % auf 2,1 nMol/g Leber ($p \leqq 0,001$). Ähnliche Befunde ergaben sich bei Bezug auf mg Proteinausbeute (s. Anhang Tab. 9).

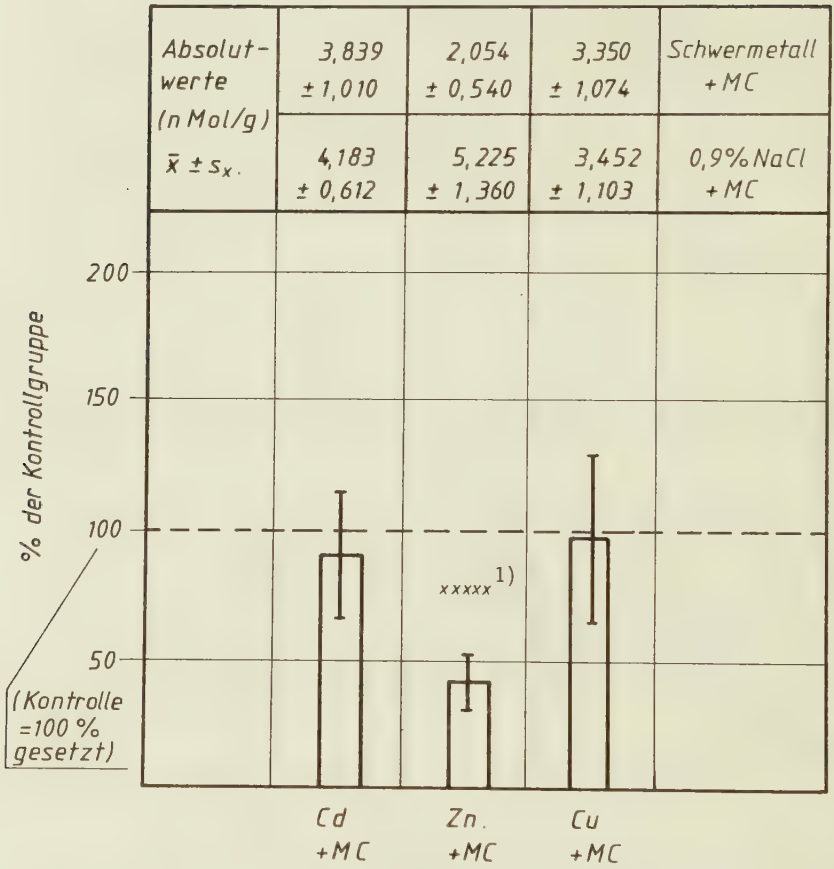
Abb. 7 Cytochrom P-450 Gehalt/g Leber von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und MC



Je 6 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag) oder Cu (1 mg/kg x Tag) und MC (10 mg/kg x Tag).
Je 6 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls MC, anstelle des Metalls jedoch 0,9 % NaCl.
Biochemische Bestimmungen erfolgten am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (T-Test):
x = $p \leq 0.1$; x x = $p \leq 0.05$; x x x = $p \leq 0.02$;
x x x x = $p \leq 0.002$; x x x x x = $p \leq 0.001$

Abb. 8 Cytochrom b_5-Gehalt/g Leber von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und MC



Je 6 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag) oder Cu (1 mg/kg x Tag) und MC (10 mg/kg x Tag).
Je 6 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls MC, anstelle des Metalls jedoch 0,9 % NaCl.
Biochemische Bestimmungen erfolgten am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (T-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.002$; * * * * * = $p \leq 0.001$

3.2.4. Enzymatische Bestimmungen

3.2.4.1. Glucose-6-Phosphatase

Nach Cd/MC-oder Cu/MC-Verabreichung blieb die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase bezogen auf mg mikrosomales Protein, nMol Cytochrom P-450 oder g Leber unverändert (s. Anhang Tab. 8,1o). Dagegen zeigte sich nach Zn/MC-Belastung eine Verminderung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität pro mg Protein (31,4 %) und pro g Leber (47,3 %), während sie bei Bezug auf Cytochrom P-450 schwach zunahm (20 %) (s. Anhang Tab. 9).

3.2.4.2. DCPIP-Reduktase

Nach Cd/MC-oder Cu/MC-Behandlung blieb die Aktivität der DCPIP-Reduktase in allen Fällen unverändert (s. Anhang Tab. 8, 1o). Nach Zn/MC-Injektion jedoch nahm die Aktivität bezogen auf nMol P-450 um 47 % zu ($p \leqq 0,05$), während sie bezogen auf g Leber um 39 % ($p \leqq 0,05$) abnahm (s. Anhang, Tab. 9).

3.2.4.3. Äthylmorphin-Demethylierung und 4-DMAB-Demethylierung

Die Aktivität der Äthylmorphin- und der 4-DMAB-Demethylierung war nach Cd/MC- oder Cu/MC-Belastung weder auf mg mikrosomales Protein oder nMol Cytochrom P-450 noch auf g Lebergewicht bezogen verändert (s. Anhang Tab. 8, 1o). Zn- und MC-Injektion bewirkte gegenüber der Kontrollgruppe bezogen auf nMol Cytochrom P-450 ebenfalls keine Aktivitätsveränderung. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch bei Bezug auf mg mikrosomales Protein und g Lebergewicht gegenüber den Kontrolltieren eine starke Aktivitätsminderung. Pro mg Protein war die Äthylmorphin-Demethylierung um 46,1 % ($p \leqq 0,05$), die 4-DMAB-Demethylierung um 61,0 % ($p \leqq 0,01$) verringert. Bezogen auf g Leberfeuchtgewicht nahm die Aktivität der Äthylmorphin-Demethylierung um 59,2 % ($p \leqq 0,01$), die der 4-DMAB-Demethylierung um 69,4 % ($p \leqq 0,01$) ab (s. Anhang Tab. 9). Diese Abnahmen entsprachen in etwa der P-450-Verminderung unter denselben Bedingungen.

3.2.4.4. Äthoxycumarindeäthylierung und deren Hemmung nach Zusatz von αNF oder MP

3.2.4.4.1. Äthoxycumarindeäthylierung

Die Aktivität der Äthoxycumarindeäthylierung war nach Cd/MC- oder Cu/MC-Behandlung gegenüber den Kontrollwerten unverändert (s. Anhang Tab. 8, 1o). Auch hier bewirkte die Zn/MC-Belastung eine Aktivitätsminderung - bezogen auf mg mikrosomales Protein und g Leber - um 50,3 % ($p \leqq 0{,}001$) bzw. 61,6 % ($p \leqq 0{,}001$), nicht jedoch in Bezug auf Cytochrom P-450 (s. Anhang Tab. 9).

3.2.4.4.2. Hemmung der mikrosomalen Aktivität der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycumarin nach Zusatz von αNF und MP

Als zusätzlicher Parameter wurde die Hemmung der Äthoxycumarin-O-Deäthylase durch Zusatz von αNF (50 µM im Test) oder MP (100 µM im Test) untersucht. Die Bestimmungen erfolgten lediglich nach Belastung mit Zn/MC oder Cd/MC. Die Enzymhemmung, die in den Cd/MC oder Zn/MC belasteten Gruppen durch αNF oder MP ausgelöst wurde, wurde mit derjenigen aus den entsprechenden NaCl/MC behandelten Kontrollgruppen verglichen (s. Anhang Tab. 11, 12). In Gegenwart von αNF war das Ausmaß der Hemmung bei den Cd/MC oder Zn/MC behandelten Gruppen dasselbe wie bei den zugehörigen Kontrollgruppen.

Beim Vergleich der Cd/MC- oder Zn/MC-exponierten Gruppen mit den Kontrollgruppen nach Zusatz des Hemmstoffes MP zeigte sich dagegen ein anderes Bild. Die Aktivität aus Tieren, die Cd/MC injiziert bekommen hatten, sank um 67,5 % auf 32,5 % des 100 %-Wertes, während die Aktivität aus den NaCl-behandelten Tieren lediglich um 46 % auf 54 % des 100 %-Wertes absank.

Der Vergleich der Zn/MC belasteten Tiere mit den Kontrolltieren zeigte ebenfalls eine deutlich verstärkte Hemmbarkeit der Äthoxycumarindeäthylase durch MP nach Schwermetallexposition. Auch hier sank die Aktivität aus der Kontrollgruppe (0,9 % NaCl/MC) schwächer, nämlich auf 53 % des 100 %-Wertes, während sie sich nach Zn/MC-Belastung auf 28,15 % verringerte.

3.2.4.5. Biphenyl-2-Hydroxylierung

Nach Cd/MC-, Zn/MC- oder Cu/MC-Exposition wurde gegenüber den Kontrolltieren in allen Fällen eine geringfügige Zunahme der Aktivität (20 - 30 %) der Biphenyl-2-Hydroxylase, bezogen auf nMol Cytochrom P-450, beobachtet. Eine geringfügige Aktivitätserhöhung ergab sich auch bei Bezug auf mg Protein oder g Leber für Cd/MC und Cu/MC, nicht hingegen für Zn/MC, wo die Aktivität vermindert war auf 67 % bzw. 53 % des Kontrollwertes ($p \leqq 0{,}05$ bzw $p \leqq 0{,}01$) (s. Abb. 9, S. 38) (s. auch Anhang Tab. 8, 9, 1o).

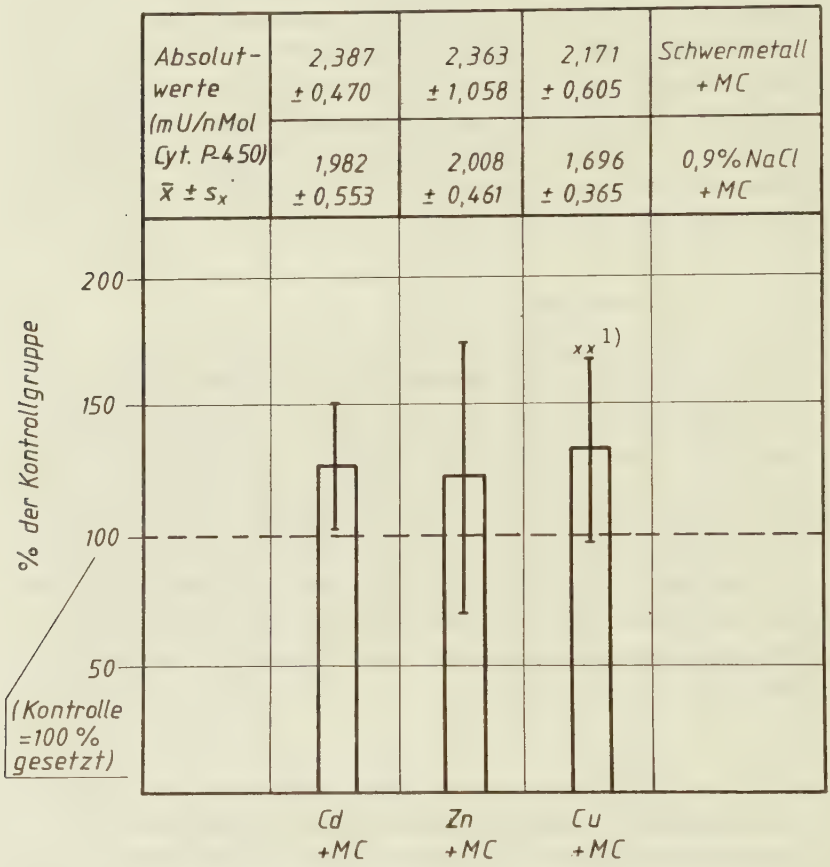
3.2.4.6. Biphenyl-4-Hydroxylierung

Die Aktivität der Biphenyl-4-Hydroxylierung aus Tieren, die mit Cd/MC belastet worden waren, war auf nMol Cytochrom P-450 bezogen um 16,1 % ($p \leqq 0{,}05$) erhöht. Bezogen auf mg mikrosomales Protein oder g Leberfeuchtgewicht zeigten sich keine Veränderungen. Die Zn/MC-Belastung bewirkte eine Abnahme der Aktivität der Biphenyl-4-Hydroxylierung pro mg mikrosomalen Proteins (auf 57 % der Kontrolle, $p \leqq 0{,}01$) und pro g Leberfeuchtgewicht (auf 46 % der Kontrolle, $p \leqq 0{,}01$). Bezogen auf nMol Cytochrom P-450 war die Aktivität unverändert. Cu/MC-behandelte Tiere und Kontrolltiere zeigten im Hinblick auf die mikrosomale Biphenyl-4-Hydroxylierung keine Unterschiede (s. Abb. 10, S. 39; s. auch Anhang Tab. 8, 9).

3.2.4.7. Obersicht

Die Belastung mit Cd/MC bewirkte gegenüber den MC-behandelten Kontrolltieren eine Verminderung des Cytochrom P-450-Gehaltes bezogen auf mg Protein ($p \leqq 0{,}05$). Auch bei Bezug auf g Leber zeigte sich eine deutliche Abnahme des Cytochrom P-450. Auffallend war auch die erhöhte Aktivität der Biphenyl-4-Hydroxylierung/nMol Cytochrom P-450 nach Cd/MC-Injektion ($p \leqq 0{,}05$), während alle übrigen Befunde unauffällig waren (.s. Anhang Tab. 8). Nach Cu/MC-Exposition ist die um fast 30 % erhöhte Aktivität der Biphenyl-2-Hydroxylierung bezogen auf Cytochrom P-450 gegenüber den Werten der Kontrollgruppe bemerkenswert. Die übrigen biochemischen Parameter sind dagegen unverändert (s. Anhang Tab. 1o).

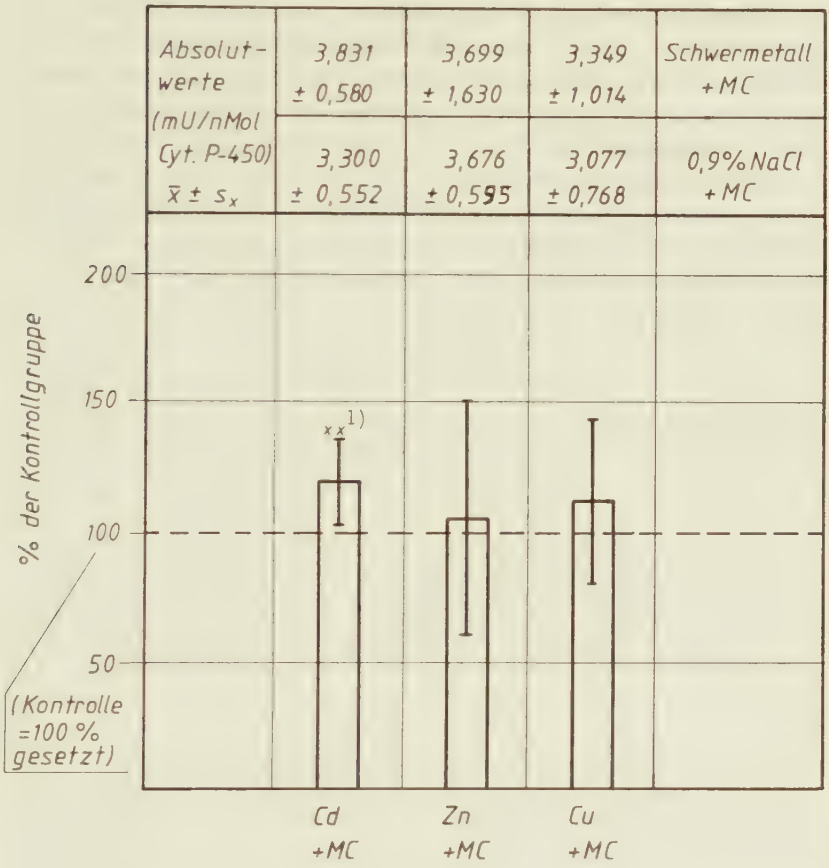
Abb. 9 Aktivität der Biphenyl-2-Hydroxylase/Cytochrom P-450 in Lebermikrosomen von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und MC



Je 6 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1.- 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag) oder Cu (1 mg/kg x Tag) und MC (10 mg/kg x Tag).
Je 6 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls MC, jedoch anstelle des Metalls 0,9 % NaCl.
Biochemische Bestimmungen erfolgten am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (T-Test):
* = $p \leq 0.1$; * * = $p \leq 0.05$; * * * = $p \leq 0.02$;
* * * * = $p \leq 0.002$; * * * * * = $p \leq 0.001$

Abb. 1o Aktivität der Biphenyl-4-Hydroxylase/Cytochrom P-450 in Lebermikrosomen von Mäusen nach simultaner Gabe von Metallen und MC



Je 6 männliche NMRI-Mäuse erhielten vom 1. - 3. Versuchstag um 17.30 Uhr ip. Cd (0,3 mg/kg x Tag), Zn (9 mg/kg x Tag) oder Cu (1 mg/kg x Tag) und MC (10 mg/kg x Tag).
Je 6 zeitlich parallel behandelte Kontrolltiere erhielten ebenfalls MC, anstelle des Metalls jedoch 0,9 % NaCl.
Biochemische Bestimmungen erfolgten am 4. Tag um 7.30 Uhr.

1) Signifikanzniveau gegenüber Kontrolle (T-Test):
* = $p \leq 0.1$; ** = $p \leq 0.05$; *** = $p \leq 0.02$;
**** = $p \leq 0.002$; ***** = $p \leq 0.001$

Betrachtet man die biochemischen Ergebnisse nach Zn/MC-Injektion, so ist die extreme Verminderung des Cytochrom P-450- und b_5-Gehaltes durch Zn der auffallendste Befund. Bezogen auf Cytochrom P-450 bleiben alle übrigen Enzymaktivitäten bis auf die DCPIP-Reduktase, die signifikant erhöht ist ($p \leqq 0{,}05$), nahezu unverändert. Die Aktivität der DCPIP-Reduktase ist jedoch, - bezogen auf mg Protein oder g Leber - wie alle übrigen Enzymaktivitäten erniedrigt. Wahrscheinlich ist, daß es sich nicht um eine Aktivitätssteigerung dieses Enzyms handelt, sondern daß beim Bezug auf Cytochrom P-450 durch die extreme Verminderung dieses Cytochroms eine Aktivitätssteigerung vorgetäuscht wird (s. Anhang Tab. 9).

4. Diskussion

4.1. Vorbemerkung

Trotz konstant gehaltener Versuchsbedingungen - wie u. a. gleichbleibender Mäusestamm, gleichbleibende Applikationsart und -zeit - war die Variabilität der biologischen und biochemischen Parameter von Versuchsgruppe zu Versuchsgruppe sehr hoch, wobei hier sicherlich das Alter der Mäuse - der Abstand zwischen den einzelnen Gruppen einer Versuchsreihe betrug mindestens eine Woche - von Bedeutung ist (Heubel et al., 1981).

Zur Beurteilung der Wirkungen von Schwermetallen und Induktoren wurden deshalb nur Vergleiche mit zeitlich genau parallel behandelten Kontrolltieren, die anstelle des Schwermetalls 0,9 % NaCl erhalten hatten, vorgenommen. Kontrolltiere ohne Induktor (nur mit 0,9 % NaCl behandelte Tiere) wurden nicht mitgeführt, da nicht die Induktion durch MC, sondern die unterschiedlichen Befunde zwischen Schwermetall/MC- und NaCl/MC-behandelten Tieren das Thema dieser Arbeit waren.

Bei den biochemischen Bestimmungen wurden lediglich Kombinationen mit MC untersucht, weil dort die ausgeprägtesten Effekte beobachtet (s. S. 24 und 25, Abb. 5 und 6) und Kombinationen von Schwermetall mit PB in diesem Institut bereits biochemisch untersucht worden waren.

4.2. Wirkung von Schwermetallen auf Hexobarbitalschlaf- oder Zoxazolaminparalysezeiten

Schwermetalle können toxisch wirken, wobei das Ausmaß der durch sie ausgelösten Veränderungen in biologischen Systemen von der Dosis, der Applikationsart und der Expositionsdauer abhängt. Der Einfluß von Cd und Pb auf Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeiten ist bereits von einigen Untersuchern beschrieben worden; übereinstimmend wurden Verlängerungen der Schlaf- und Paralysezeit beobachtet (Alvares et al., 1972; Chow und Chornish, 1978; Johnston et al., 1974; Krasny et al., 1977; Means und Schnell, 1980; Pence und Schnell, 1980; Roberts et al., 1976; Schnell et al., 1978). Außerdem wurde fast immer eine Verringerung der Aktivität mikrosomaler Cytochrom P-450-abhängiger Enzyme festgestellt (Goldberg et al.,

1978; Krasny et al., 1977; Maines und Kappas, 1978; Teare et al., 1977; Unger et al., 1973; Yoshida et al., 1977).

Diese Befunde stimmen mit meinen Ergebnissen bei Cd- und Pb-vorbehandelten Mäusen im Wesentlichen überein. Neu sind meine Befunde an Cu- und Zn-behandelten Tieren. Schlaf- bzw. Paralysezeiten wurden durch Cu schwach, jedoch nicht signifikant, durch Zn stark verlängert ($p \leq 0{,}01$). Erstaunlich sind die starken Wirkungen, die Zn-Dosierungen von 9 mg/kg x Tag auf den Stoffwechsel von Mäusen ausüben. Der tägliche Bedarf des Menschen an Zn beträgt ca. 200 µg/kg x Tag, während er bei Cu mit ca. 15 - 45 µg/kg x Tag angegeben wird (Friberg et al., 1979).

Während Kupfer - wie Zink ein essentielles Spurenelement - jedoch bei einer Dosierung von 1 mg/kg x Tag kaum metabolische Veränderungen im Tierversuch auslösen konnte, verursachte Zink bei einer Dosierung von 9 mg/kg x Tag eine starke Stoffwechseldepression. Die um Faktor 9 höhere Dosierung an Zink entspricht beim Menschen etwa dem täglichen Mehrbedarf. Möglicherweise ist die Toleranz des Säugetierorganismus gegenüber Veränderungen des Zinkhaushaltes im Hinblick auf Stoffwechselwirkungen sehr viel kleiner als beim Kupfer.

Es wäre denkbar, daß Schwermetalle ihre prolongierende Wirkung auf Schlaf- und Paralysezeiten über einen direkten zentralnervösen Angriffspunkt - etwa über eine Erniedrigung der Blut-Hirnschranke oder eine verbesserte Bindung der verabreichten Pharmaka an Rezeptoren - ausüben. Allgemein gelten jedoch die nach Schwermetallexposition beobachteten Schlaf- und Paralysezeitverlängerungen als Ausdruck einer verminderten Aktivität der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidasen. Ursache für die Verminderung der mikrosomalen Enzymaktivitäten scheint eine allgemeine Verminderung des Cytochrom P-450-Gehaltes als Folge einer Steigerung des Hämabbaus zu sein:

Krasny et al. (1977) stellten fest, daß nach akuter Cd-Behandlung die Hämoxygenase aktiviert ist. Als Erklärung dieser Aktivierung wird dort eine Metall-induzierte Hämoproteinfreisetzung nach Zerstörung mikrosomaler Membranen infolge verstärkter Lipidperoxidation oder durch Freisetzung proteolytischer Enzyme angeführt. Das freigesetzte Häm könnte dann über einen feed-back Mechanismus seinen eigenen Abbau aktivieren.

Im Zusammenhang mit den Effekten von Cd wird außerdem diskutiert:

1. Eine Senkung der Hämproteinsynthese durch direkte Interaktion mit DNA oder RNA,
2. ein biphasischer Effekt des Cd auf die DNA und RNA, wobei abhängig von Dosis und Expositionsdauer ein stimulierender oder hemmender Cd-Effekt auf die RNA-Synthese ausgeübt werden soll (Stoll et al., 1976),
3. die selektive Stimulierung oder Zerstörung ausgewählter P-450-Aktivitäten nach bisher unbekannten Mechanismen (Hietanen, 1978; Legrum et al., 1979; Stebbins und Schnell, 1980).

4.3. Wirkungen von Schwermetallen in Kombination mit Induktoren

Da Schwermetalle vermutlich häufig in Verbindung mit anderen Fremdstoffen - z.B. Kanzerogenen, Medikamenten und Insektiziden - aufgenommen werden, ist ihre Wechselwirkung mit solchen Fremdstoffen von großer toxikologischer Bedeutung.

Induktoren vom Phenobarbitaltyp erhöhen die Konzentration von Cytochrom P-450, die Hämsynthese und die Aktivität der NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase. Die Hexobarbitalschlaf- und - in geringem Maße - die Zoxazolaminparalysezeit wird verkürzt (Conney, 1967; Gillette et al., 1972; Rees, 1979).

Methylcholanthren steigert die N-Demethylierung von Azofarbstoffen und die Hydroxylierung von 3,4-Benzpyren und Anilin. Dabei nimmt meistens der Gehalt an Cytochrom P-448 zu unter gleichzeitiger Verkürzung der Zoxazolaminparalysezeit (Conney, 1967; Gillette et al., 1972; Nebert und Jensen, 1979).

Die Wirkungen einer Cd- oder Pb-Exposition auf den Stoffwechsel und Schlaf- bzw. Paralysezeiten sind dem genau entgegengesetzt (s. auch 1.1.4.1. und 1.1.4.2.), während Cu-reiche Diät den Riboflavingehalt und die Aktivität der DAB-Azoreduktase in Rattenlebermikrosomen erhöht (Yamane et al., 1978) und vermehrte orale Zn-Zufuhr die Induzierbarkeit mikrosomaler Enzyme durch PB in Ratten verstärkt (Chiculescu und Inicescu, 1974).

Im folgenden soll diskutiert werden, ob die in Gegenwart der Induktoren MC und PB beobachtete Beeinflussung der Hexobarbitalschalf- bzw. Zoxazolaminparalysezeiten durch Schwermetalle anhand entsprechender Aktivitätsveränderungen Cytochrom P-448-bzw. P-450-abhängiger Enzymaktivitäten erklärt werden kann.

4.3.1. Cadmium in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren

In der Gruppe mit Cd-Exposition und simultaner PB-Gabe ist die Verkürzung der Hexobarbitalschlafzeit gegenüber der Kontrollgruppe (0,9 % NaCl/PB) bemerkenswert. Die nach alleiniger Cd-Gabe beobachtete Verlängerung der Hexobarbitalschlafzeit ist hier trotz gleicher Dosis, Applikationsart und Einwirkungszeit des Cd ins Gegenteil verkehrt.

Diese Befunde stimmen gut mit Ergebnissen von Dieter et al. (1979) überein, die bei Mäusen nach einer kombinierten, aufeinanderfolgenden Behandlung mit Cd und PB gegenüber NaCl/PB-behandelten Tieren eine Verkürzung der Hexobarbitalschlafzeit fanden, was für eine Verstärkung der PB-Induktion durch Cd spricht. Außerdem fanden sie bei den Tieren, die Cd und PB erhalten hatten, einen höheren Cytochrom P-450-Gehalt als bei den Tieren, die nur NaCl und PB erhalten hatten. Der erhöhte Cytochrom P-450-Gehalt dürfte zu einer beschleunigten 3-Hydroxylierung von Hexobarbital führen. Man kann annehmen, daß dieser aktivierende Einfluß des Cd auch unter dem simultanen Einfluß von PB noch überlagert ist von der hemmenden Wirkung dieses Metalls auf P-450-abhängige Enzyme (s. 4.2.), so daß der aktivierende Einfluß, könnte man ihn experimentell von dem hemmenden trennen, stärker als beobachtet sein dürfte.

Die erhöhte Hemmbarkeit der Äthoxycumarin-Deäthylierung durch MP (Hemmstoff phenobarbitalinduzierbarer Cytochrome; Ullrich et al., 1975) bei den Cd/MC-behandelten Tieren (im Vergleich zu den NaCl/MC-behandelten Tieren) bei unveränderter Hemmbarkeit durch αNF (Hemmstoff MC-induzierbarer Cytochrome; Ullrich et al., 1975) zeigt, daß offenbar das Cytochrom P-450-Muster zugunsten hydroxylierender phenobarbitaltypischer Cytochrome verändert wurde.

In Übereinstimmung damit steht die Aktivitätssteigerung der Biphenyl-4-Hydroxylierung nach Cd/MC-Belastung ($p \leq 0{,}05$) (Burke, 1975). Zwar war die Hexobarbitalschlafzeit nach Cd/MC-Injektion schwach verlängert, die nach alleiniger Cd-Belastung beobachtete deutliche Schlafzeitverlängerung ($p \leq 0{,}02$) gegenüber den jeweiligen Kontrollen blieb jedoch aus. Demgegenüber war die Zoxazolaminparalysezeit nach Cd/MC-Behandlung gegenüber den Kontrolltieren sehr stark verlängert (auf 329,9 % der Kontrolle; $p \leq 0{,}02$).

Alle diese Befunde sprechen dafür, daß Cd in Verbindung mit MC zu einer verstärkten Induktion bestimmter, sonst nur phenobarbitalinduzierbarer Cytochrome führt und durch die vermehrt gebildeten Isoenzyme der Barbituratumsatz stärker beschleunigt wird als derjenige von aromatischen Kohlenwasserstoffen. Daß der Gesamt P-450-Gehalt dennoch abnimmt, ließe sich damit erklären, daß Cd auch in Anwesenheit von MC gleichzeitig bestimmte Cytochrome inaktiviert.

4.3.2. Zink in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren

In allen Gruppen zeigten sich nach Gabe von Zn in Kombination mit PB oder MC ausgeprägte Verlängerungen der Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeiten gegenüber den Kontrolltieren. Die gleichzeitige Behandlung mit Zn und MC scheint jedoch die depressive Wirkung des Zinks auf den Metabolismus noch zusätzlich zu verstärken. Demgegenüber ist offenbar bei kombinierter Verabreichung von Zn und PB diese Stoffwechselhemmung des Zn durch PB wenigstens teilweise kompensiert (s. auch Ab.. 3, 4, 5, 6).

Auffallendster biochemischer Befund war die extrem starke Abnahme des Cytochrom P-450-Gehaltes nach Zn/MC-Injektion, während alle Enzymaktivitäten (bezogen auf Cytochrom P-450) unverändert blieben. Die starke Verringerung dieser Aktivitäten pro mg Protein bzw. pro g Leber läßt sich mit der Verringerung des Cytochrom P-450-Gehaltes pro g Leber erklären.

Die Abnahme des Cytochromgehaltes ist wohl für die hohe, gegenüber den nur mit Zn (ohne MC) belasteten Tieren zusätzliche Verlängerung der Hexobarbitalschlaf- bzw. Zoxazolaminparalysezeit verantwortlich (465,4 %

und 329,7 % der Kontrolle). Die Kombination von Zn und MC verstärkt damit erstaunlicherweise die hemmende Wirkung des Zn auf den mikrosomalen Metabolismus von NMRI-Mäusen.

Demgegenüber spricht die nach Zn/PB beobachtete Verkürzung der Schlaf- und Paralysezeiten gegenüber den allein mit Zn belasteten Tieren dafür, daß sich Zn und PB in ihren Auswirkungen auf den mikrosomalen Stoffwechsel teilweise kompensieren.

Im Metyraponhemmtest zeigte sich wie beim Cd eine stärkere Hemmung der Aktivität der Äthoxycumarindeäthylierung Zn/MC behandelter Tiere im Vergleich zu den parallel mit NaCl/MC behandelten Tieren, während die Hemmung durch αNF in beiden Gruppen nahezu gleich war. Die Gesamtaktivität der Äthoxycumarindeäthylierung/nMol Cytochrom P-450 war unverändert. Dieser Befund spricht - wie schon für Cd beschrieben - ebenfalls für eine Vermehrung sonst nur durch Phenobarbital induzierbarer Cytochrome unter dem kombinierten Einfluß von Zn und MC.

4.3.3. Kupfer in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren

Die kombinierte Gabe von Cu und PB bewirkte keine signifikanten Änderungen der Schlaf- und Paralysezeiten gegenüber den mit 0,9 % NaCl und PB behandelten Kontrolltieren. Die nach alleiniger Cu-Gabe festgestellte leichte Verlängerung von Schlaf- bzw. Paralysezeiten konnte bei kombinierter Injektion von Cu und PB nicht mehr beobachtet werden; beide Parameter waren nach Cu/PB-Exposition sogar deutlich kürzer als bei den nur mit Cu behandelten Tieren.

Nach Cu/MC-Behandlung zeigte sich gegenüber den NaCl/MC behandelten Tieren eine signifikante Verkürzung der Zoxazolaminparalysezeit ($p \leqq 0{,}05$) während die Hexobarbitalschlafzeit schwach verlängert war. Zoxazolamin wird wie Hexobarbital vorwiegend hydroxyliert, wobei Methylcholanthren als typischer Induktor des Zoxazolaminmetabolismus gilt. Die gegenüber den Kontrolltieren (0,9 % NaCl/MC) verkürzte Paralysezeit ($p \leqq 0{,}05$) spricht für eine gesteigerte Aktivität methylcholanthrentypischer Cyto-

chrome, die die Hydroxylierung von Zoxazolamin beschleunigen. Die beobachtete Verkürzung der Paralysezeit paßt gut zu der erhöhten Aktivität der Biphenyl-2-Hydroxylierung nach Cu/MC-Injektion, weil die Biphenyl-2-Hydroxylierung in Mäusen ebenfalls in erster Linie durch Methylcholanthren induziert wird (Conney, 1967; Nebert und Jensen, 1979). Aus diesen Befunden läßt sich ableiten, daß Cu in Verbindung mit MC den Umsatz von aromatischen Kohlenwasserstoffen, wie z.B. Zoxazolamin, zusätzlich beschleunigt.

Bei der Hydroxylierung aromatischer Kohlenwasserstoffe entstehen u. a. Epoxide, die in vitro zum Teil sehr reaktionsfähig sind und deshalb als proximale Karzinogene infrage kommen. Dies könnte bedeuten, daß Cu, wenn es in Kombination mit aromatischen Kohlenwasserstoffen das endoplasmatische Retikulum der Leber erreicht, als Kokanzerogen wirkt.

4.3.4. Blei in Kombination mit Phenobarbital oder Methylcholanthren

Pb und simultane Induktion mit PB bewirkte nahezu keine Veränderungen von Hexobarbitalschlaf- oder Zoxazolaminparalysezeiten. Wiederum war die nach alleiniger Pb-Belastung beobachtete Verlängerung von Schlaf- bzw. Paralysezeiten nicht mehr vorhanden, vielmehr die Schlaf- und Paralysezeiten herabgesetzt. Im Gegensatz dazu waren nach kombinierter Behandlung mit Pb und MC die Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeiten leicht verlängert.

Verschiedene Autoren (Alvares et al., 1972; Chow und Chornish, 1978; Goldberg, 1978) diskutieren, daß es durch Blei über eine Hemmung der Hämsynthese zur Abnahme des mikrosomalen Cytochromgehaltes kommt, was gut mit den von mir beobachteten Verlängerungen der Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeiten nach Pb/MC-Injektion übereinstimmen würde.

Wegen wenig ausgeprägter in vivo Befunde wurden für die simultane Verabreichung von Pb und MC keine weiteren biochemischen Parameter bestimmt.

4.3.5. Schwermetalle und Metabolismus der Induktoren

Neben den schon angesprochenen Möglichkeiten sind für die potenzierende Wirkung von Cd, Zn, Cu und Pb auf den PB-abhängigen Induktionsprozeß mikrosomaler Cytochrome möglicherweise nicht nur die Schwermetalle an sich verantwortlich, sondern auch der durch Schwermetalle verringerte Abbau des Induktors. Er könnte dann stärker induzierend wirken, als das Schwermetall seinerseits Cytochrom P-450 zerstört (s. 4.2). Damit ließe sich die Verkürzung der Hexobarbitalschlafzeit der Cd/PB-behandelten Tiere gegenüber den NaCl/PB-behandelten Tieren erklären. Hierfür spricht auch das Fehlen der nach alleiniger Cu- oder Pb-Behandlung erzielten schwachen Verlängerung von Schlaf- bzw. Paralysezeiten nach zusätzlicher simultaner Induktion mit PB und die teilweise kompensierte Depression des mikrosomalen Stoffwechsels nach Zn/PB-Injektion.

Demgegenüber konnten bei kombinierter Gabe von Cd, Zn oder Pb und MC die Schlaf- und Paralysezeiten nicht verkürzt werden. In allen drei Fällen wurden nach simultaner Injektion von Schwermetall und MC sogar gegenüber der reinen Schwermetallbelastung verlängerte Schlaf- und Paralysezeiten gemessen, was auf eine zusätzliche Depression des mikrosomalen Stoffwechsels in Gegenwart von Metall und MC deutet. Lediglich bei den Cu/MC behandelten Tieren war die Paralysezeit verkürzt, was für einen Induktionserfolg sprechen könnte.

Die Induzierbarkeit zahlreicher Cytochrom P-450-abhängiger mikrosomaler Aktivitäten durch aromatische Kohlenwasserstoffe wird bei Mäusen autosomal dominant vererbt, wobei ein von Gielen et al. (1972) beschriebener Ah-Locus Sitz der erforderlichen Struktur- und Regulatorgene sein soll. Als Kriterium für die Induzierbarkeit von Mäusen durch aromatische Kohlenwasserstoffe geben Nebert et al. (1973) ein Verhältnis der Cytochrom P-450-Konzentration von MC-behandelten Mäusen gegenüber 0,9 % NaCl-behandelten Kontrollmäusen von 1,6 - 2,1 an. Dabei werden Mäuse, bei denen dieser Quotient 1,o - 1,3 beträgt als nicht responsiv angesehen. Bei den von mir benutzten NMRI-Mäusen lag dieser Quotient zwischen 0,8 und 1,3 was für nicht - Responsivität dieses von mir verwendeten Mäusestammes spricht (institutseigene Ergebnisse, mündliche Mitteilung Dr. Dieter).

5. Zusammenfassung

Es wurde untersucht:

1.) wie sich einzelne Aktivitäten der MFO aus Mäuseleber unter dem Einfluß von vier ausgewählten Schwermetallen (Cadmium, Zink, Kupfer, Blei) verhalten und

2.) ob sich die Induzierbarkeit dieser Aktivitäten durch Phenobarbital oder Methylcholanthren bei gleichzeitiger Gabe eines dieser Schwermetalle verändern läßt.

Als Meßparameter für die Induktion der mischfunktionellen Oxidase durch Phenobarbital bzw. Methylcholanthren dienten:

1.) in vivo die Hexobarbitalschlaf- bzw. Zoxazolaminparalysezeiten und

2.) in vitro ausgewählte, bezüglich ihrer Induzierbarkeit durch Phenobarbital oder Methylcholanthren bekannte Aktivitäten der mikrosomalen mischfunktionellen Oxidase.

Die Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeiten waren nach alleiniger Schwermetallexposition verlängert, die Umwandlung dieser Substanzen in metabolisch inaktive Folgeprodukte demnach verzögert.

Bei gleichzeitiger Gabe der Induktoren Methylcholanthren oder Phenobarbital jedoch war die Wirkungsdauer von Hexobarbital und Zoxazolamin durch die vier genannten Schwermetalle in unterschiedlicher Weise verändert:

1.) in Kombination mit Phenobarbital wirkte Cadmium schlafzeitverkürzend, also gegensinnig bezüglich seiner Wirkung in Abwesenheit von Phenobarbital.

Zink wirkte dagegen auch in Gegenwart von Phenobarbital schlaf- und paralysezeitverlängernd, doch waren die beobachteten prozentualen Veränderungen geringer als in Abwesenheit dieses Induktors.

Dies heißt auf der Ebene des Cytochrom P-450, daß beide Metalle in Gegenwart von Phenobarbital in vivo ihre Cytochrom zerstörende Wirkung ganz oder teilweise einbüßen bzw. die Induktion neuer Cytochrome auslösen.

2.) Im Gegensatz dazu wurde durch die simultane Verabreichung von Cadmium und Methylcholanthren, Zink und Methylcholanthren oder Blei und Methylcholanthren keine Verkürzung, sondern eine Verlängerung von Schlaf- bzw. Paralysezeiten gegenüber Tieren erzielt, die lediglich 0,9 % NaCl und den Induktor erhalten hatten. Parallel dazu wurde vor allem bei Zink, aber auch bei Cadmium eine Depression des mikrosomalen Cytochrom P-450-Gehaltes beobachtet.

Die verstärkte Hemmbarkeit der Äthoxycumarindeäthylierung durch Metyrapon nach Cadmium/Methylcholanthren bzw. Zink/Methylcholanthren-Injektion gegenüber den nur mit 0,9 % NaCl/Methylcholanthren behandelten Kontrollen spricht für eine Verschiebung der Cytochrom P-450-Substratspezifität in Richtung vermehrt phenobarbitalinduzierbarer Aktivitäten durch Cadmium oder Zink und/oder einen bevorzugten Abbau Methylcholanthren-induzierbarer Aktivitäten unter dem kombinierten Einfluß von Methylcholanthren und einem dieser beiden Metalle.
Auffallend ist, daß bei simultaner Verabreichung eines Schwermetalles und eines Induktors die Induktion in einem Fall gehemmt, im anderen aktiviert wird.
Ob im Falle der Aktivierung des mikrosomalen Stoffwechsels (Induktor Phenobarbital) unter dem Einfluß der Metalle allein der verzögerte Abbau des Induktors und damit ein verstärkter Induktionseffekt oder zusätzlich ein peripherer Schwermetalleffekt in Kombination mit dem Induktor eine Rolle spielt, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden.

Literaturverzeichnis

Alvares,A.P., Leigh,S., Cohn,J., Kappas,A.:

Lead and Methyl Mercury: Effects of Acute Exposure on Cytochrome P-450 and the Mixed Function Oxidase System in the Liver.
J. Exp. Med. 135, 1406-1409, 1972.

Baginski,E.S., Fao,P.P., Zak,B.:

Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim 1, 909-913, 1970.

Burch,R.E., Hahn,H.K.J., Sullivan,J.F.:

Newer Aspects of the Roles of Zinc, Manganese and Copper in Human Nutrition.
J. Clin. Chem. 21/4, 501-520, 1975.

Burke,M.P.:

The Effects of the Non-Ionic Detergent Tween 80 on Hepatic Microsomal Hydroxylation.
Xenobiotica 5, 261-277, 1975.

Burns,J.J., Yü,T.F., Berger,L., Gutman,A.B.:

Zoxazolamine.
Am. J. Med. 25, 401-408, 1958.

Cartwright,G.E., Wintrobe,M.M.:

Copper Metabolism in Normal Subjects.
Am. J. Clin. Nutr. 14, 224-232, 1964a.

Cartwright,G.E., Wintrobe,M.M.:

The Question of Copper Deficiency in Man.
Am. J. Clin. Nutr. 15, 94-110, 1964b.

Chiculescu,O., Onicescu,D.:

Changes of the Liver Enzymatic Functions Induced by Zinc Ions and Phenobarbital.
Arch. Roum. Pathol. Exp.. Microbiol. 33, 307-311, 1974.

Chow,C.P., Cornish,H.H.:

Effects of Lead and the Induction of Hepatic Microsomal Enzymes by Phenobarbital and 3,4-Benzpyrene.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 43, 219-228, 1978.

Comai,K., Gaylor,J.L.:

Existence and Separation of Three Forms of Cytochrome P-450 from Rat Liver Microsomes.
J. Biol. Chem. 248, 4917-4955, 1973.

Conney,A.H.:

Pharmacological Implications of Microsomal Enzyme Induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317-366, 1967.

Cumbrowski,J.:

Pathophysiologische Wirkungen des Cadmiums auf den menschlichen Organismus.
Z. Ärztl. Fortbild. (Jena) 69, 876-879, 1976.

Dieter,H.H., Abel,J., Ohnesorge,F.K.:

Additional Induction of Microsomal Cytochrome(s) P-450 in Mouse Liver by Consecutive Application of Cadmium Chloride and Phenobarbital.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 24, 377-388, 1979.

Early,J.L., Schnell,R.C.:

Zinc-Induced Protection Against Cadmium; Alteration of Drug Action.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 19, 369-372, 1978.

Food, Nutr. Board:

Recommended Dietary Allowances, 8th Revised Version, p. 99-101.
National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1974.

Friberg,L., Nordberg,G.F., Vouk,V.B.:

Handbook on the Toxicology of Metals.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam-New York - Oxford, 1979.

Gerber,N., Lynn,R., Holcomb,R., Weller,W.L., Bush,M.T.:

The Metabolismus of Hexobarbital in Mice and Methodology for Isolation and Quantitation of its Metabolites in vivo and in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 177, 234-245, 197o.

Gielen,J.E., Goujon,F.M., Nebert,D.W.:

Genetic Regulation of Arylhydrocarbon Hydroxylase Induction II. Simple Mendelian Expression of Mouse Tissues in vivo.
J. Biol. Chem. 247, 1125-1137, 1972.

Gillette,J.R., Davis,D.C., Sasame,H.A.:

Cytochrome P-450 and its Role in Drug Metabolism.
Ann. Rev. Pharmacol. 12, 57-84, 1972.

Goldberg,A., Meredith,P.A., Miller,S., Moore,M.R., Thompson,G.G.:
Hepatic Drug Metabolism and Haem Biosynthesis in Lead-Poisoned Rats.
Br. J. Pharmacol. 62, 529-536, 1978.

Halsted,J.A., Smith,J.C., Irwin,M.I.:

A Conspectus of Research on Zinc Requirements of Man.
J. Nutr. 1o4, 345-378, 1974.

Hartree,E.F.,

Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response.
Anal. Biochem. 48, 422-427, 1972.

Hayaishi,O.:

Oxygenases.
Academic Press, New York, p. 1-29, 1962.

Heubel,F., Hedrich,H.J., Kuhn-Nentwig,L.:

Cytochrom P-450: Sources of Variability in Mice.
Arch. Pharmacol. (Supplement to Volume 316), 22, R 6, 1981.

Hietanen,E.:

Cadmium-Induced Tissue Specific Changes in Drug Biotransformation Rates in Rats.
Arch. Environm. Contam. Toxicol. 7, 291-3oo, 1978.

Irons,R.D., Smith,J.C.:

Prevention by Copper of Cadmium Sequestration by Metallothionein in Liver.
Chem. Biol. Interact. 15, 289-291, 1976.

Johnson,E.F., Schwab,G.E., Müller-Eberhard,U.:

Multiple Forms of Cytochrome P-450: Catalytic Differences Exhibited by Two Homogeneous Forms of Rabbit Cytochrome P-450.
Mol. Pharmacol. 15, 7o8-718, 1979.

Johnston,R.E., Miya,T.S., Schnell,R.C.:

Cadmium Potentiation of Drug Response: Role of the Liver.
Biochem. Pharmacol. 24, 877-881, 1974.

Krasny,H.C., Holbrook,D.J.:

Effects of Cadmium on Microsomal Hemoproteins and Heme Oxygenase in Rat Liver.
Mol. Pharmacol. 13, 759-765, 1977.

Legrum,W., Stuehmeier,G., Netter,K.J.:

Cobalt as a Modifier of Microsomal Monooxygenases in Mice.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, 195-2o4, 1979.

Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.:

Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.

Lu,A.Y.H., Junk,K.W., Coon,M.J.:

Resolution of the Cytochrome P-450 Containing Hydroxylation System of Liver Mecrosomes into Three Components.
J. Biol. Chem. 244, 3714-3721, 1969.

Lu,A.Y.H., Levin,W.:

The Resolution and Reconstitution of the Liver Microsomal Hydroxylation System.
Biochem. Biophys. Acta 344, 2o5-24o, 1974.

Maines,M.D., Kappas,A.:

Regulation of Cytochrome P-450 Dependent Microsomal Drug-metabolizing Enzymes by Nickel, Cobalt and Iron.
Clin. Pharmacol. Ther. 22, 78o-79o, 1978.

Mason,H.S.:

Mechanism of Oxygen Metabolism.
Advan. Enzymol. 19, 79-233, 1957.

Masters,B.S.S., Williams,Ch.K., Kamin,H.:

The Preparation and Properties of Microsomal DPNH-Cytochrome-c-reductase from Pig Liver.
Methods Enzymol. X, 565, 1967.

Nash,T.:

The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction.
Biochem. J. 55, 416-421, 1953.

Nebert,D.W., Considine,N., Owens,I.S.:

Genetic Expression of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction. Control of Other Aryl Hydrocarbon-inducible-Monooxygenase Activities at or Near the Same Genetic Locus.
Arch. Biochem. Biophys. 157, 148-159, 1973.

Nebert,D.W., Jensen,N.M.:

The Ah-Locus: Genetic Regulation of the Metabolism of Carcinogens, Drugs and Other Environmental Chemicals by Cytochrome P-450 Mediated Monooxygenases.
CRC Crit. Rev. Biochem. 4o1-437, 1979.

Nebert,D.W., Eisen,H.J., Negishi,M., Lang,M.A., Hjelmeland,L.N.:

Genetic Mechanisms Controlling the Induction of Polysubstrate Monooxygenase (P-450) Activities.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 431-462, 1981.

Nordberg,G.F.:

Effects of Acute and Chronic Cadmium Exposure on the Testicles of Mice with Special Reference to Protective Effects of Metallothionein.
Environ. Physiol. 1, 171-187, 1971.

Nordberg,M., Nordberg,G.F.:

Distribution of Metallothionein-bound Cadmium and Cadmium Chloride in Mice: Preliminary Studies.
Environ. Health Perspect. 12, 1o3-1o8, 1975.

Omura,T., Sato,R.:

The Carbonmonoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. Evidence for its Hemoprotein Nature.
J. Biol. Chem. 239, 237o-2378, 1964.

Omura,T., Sato,R.:

The Carbonmonoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, Purification and Properties.
J. Biol. Chem. 239, 2379-2385, 1964a.

Rees,D.E.:

The Mechanism of Induction of the Microsomal Drug Hydroxylating System in Rat Liver by Phenobarbital.
Gen. Pharmacol. 10, 341-35o, 1979.

Roberts,S.A., Miya,T.S., Schnell,R.C.:

Tolerance Development to Cadmium-induced Alteration of Drug Action.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 14/1, 197-2oo, 1976.

Sachs,L.:

Angewandte Statistik.
Springer-Verlag, 3. Auflage, 23o-238, 1973, Berlin - Heidelberg - New York.

Schnell,R.C., Yukas,E.M., Pence,D.H., Means,J.R., Roberts,S.A., Yau,E.T., Miya,T.S., Mennear,J.H.:

Effect of Acute and Chronic Cadmium Treatment on Hepatic Drug Metabolism in Male Rats.
Arch. Toxicol. 40, 269-277, 1978.

Schulze,H.U., Staudinger,H.:

Struktur und Funktion des endoplasmatischen Retikulums.
Naturwissenschaften 62, 331-34o, 1975.

Stebbins,G.G., Schnell,C.:

Effect of Cadmium on Phenobarbital and Polycyclic Hydrocarbon-induced Alterations in Hepatic Microsomal Monooxygenase Activity in the Rat.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 274-285, 198o.

Stoll,E.R., White,J.F., Miya,T.S., Bousquet,W.F.:

Effects of Cadmium on Nucleic Acid and Protein Synthesis in Rat Liver.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 61-74, 1976.

Teare,F.W., Jasansky,P., Renaud,L., Read,P.R.:

Acute Effect of Cadmium on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in the Rat.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 57-65, 1977.

Ullrich,V., Weber,P.:

The O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin by Liver Microsomes.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1171-1177, 1972.

Ullrich,V., Weber,P., Wollenberg,P.:

Tetrahydrofurane-an Inhibitor for Ethanol-induced Liver Microsomal Cytochrome P-450.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 8o8-813,1975.

Umweltbundesamt:

Luftqualitätskriterien für Cadmium, Bericht Nr. 4/1977.
Dietrich Reimer Verlag, Berlin.

Umweltbundesamt:

Luftqualitätskriterien für Blei, Bericht Nr. 3/1976.
Dietrich Reimer Verlag, Berlin.

Unger,M., Claussen,J.:

Liver Cytochrome P-450 Activity After Intraperitoneal Administration of Cadmiumsalts in the Mouse.
Environ. Physiol. Biochem. 3, 236-242, 1973.

Wahle,K.W.J., Davies,N.T.:

Involvement of Copper in Microsomal Mixed-function Oxidase Reactions: a Review.
J. Sci. Food. Agric. 28, 93-97, 1977.

Webb,M.:

The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 2o5-22o, 1979, Amsterdam - New York - Oxford.

Whitlock,J.P., Gelboin,H.V.:

Aryl Hydrocarbon (Benzo(a)pyrene) Hydroxylase Induction in Cells in Culture.
Pharmacol. Ther. 4, 587-599, 1979.

Yamane,Y., Sakai,K., Shibata,M.:

Effect of Copper and Riboflavin on Azoreductase Activity in the Liver of Rats.
Chem. Pharm. Bull. 26, 251-255, 1978.

Yoshida,T., Ito,Y., Suzuki,Y.:

Inhibition of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes by Cadmium in Mice.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 15/4, 4o2-4o5, 1976.

Tab. 4:

Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeit nach Injektion von Cadmium, Cadmium/Phenobarbital und Cadmium/Methylcholanthren (in min)

injizierte Substanzen*	Hexobarbital (min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%	Zoxazolamin (min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%
Cd (0,3 mg/kg)	35,3o ± 7,37	$p \leq 0,02$	147,5 %	37,52 ± 1,8	$p \leq 0,05$	145,4 %
0,9 % NaCl	23,94 ± 9,63		100 %	25,8 ± 10,8		100 %
Cd (0,3 mg/kg) und PB (50 mg/kg)	13,36 ± 3,43	$p \leq 0,1$	56 %	34,76 ± 4,68	n.s.	1o1,3 %
o,9 % NaCl und PB (50 mg/kg)	23,87 ± 6,24		100 %	34,33 ± 8,47		100 %
Cd (0,3 mg/kg) und MC (10 mg/kg)	4o,96 ± 15,95	n.s.	131,3 %	39,86 ± 13,1	$p \leq 0,02$	229,2 %
0,9 % NaCl und MC (10 mg/kg)	31,19 ± 10,76		100 %	17,39 ± 4,56		100 %

* Intraperitoneale Injektion der Substanz (Spalte 1) an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr und Messung der Schlaf- oder Paralysezeit am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Tab. 5:

Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeit nach Injektion von Zink, Zink/Phenobarbital und Zink/Methylcholanthren (in min)

injizierte Substanzen*	Hexobarbital			Zoxazolamin		
	(min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%	(min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%
Zn (9 mg/kg)	75,72 ± 39,39	$p \leq 0{,}01$	300 %	62,83 ± 21,51	$p \leq 0{,}01$	239,3 %
0,9 % NaCl	25,19 ± 12,74		100 %	26,26 ± 9,41		100 %
Zn (9 mg/kg) und PB (50 mg/kg)	24,08 ± 5,63	$p \leq 0{,}002$	165,7 %	33,55 ± 15,86	$p \leq 0{,}1$	171,1 %
0,9 % NaCl und PB (50 mg/kg)	14,53 ± 4,74		100 %	19,61 ± 3,25		100 %
Zn (9 mg/kg) und MC (10 mg/kg)	101,04 ± 24,25	$p \leq 0{,}002$	465,4 %	75,93 ± 27,68	$p \leq 0{,}05$	329,7 %
0,9 % NaCl und MC (10 mg/kg)	21,71 ± 5,8		100 %	23,o3 ± 8,2		100 %

* Intraperitoneale Injektion der Substanzen (Spalte 1) an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr und Messung der Schlaf- oder Paralysezeit am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Tab. 6:

Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeit nach Injektion von Kupfer, Kupfer/Phenobarbital und Kupfer/Methylcholanthren (in min)

injizierte Substanzen	Hexobarbital (min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%	Zoxazolamin (min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%
Cu (1 mg/kg)	44,54 ± 17,07	n.s.	132,3 %	39,44 ± 16,3	n.s.	140,4 %
0,9 % NaCl	33,67 ± 13,08		100 %	28,1 ± 14,25		100 %
Cu (1 mg/kg) und PB (50 mg/kg)	13,45 ± 4,41	n.s.	95,2 %	17,18 ± 3,09	n.s.	79,7 %
0,9 % NaCl und PB (50 mg/kg)	14,13 ± 4,26		100 %	21,56 ± 7,96		100 %
Cu (1 mg/kg) und MC (10 mg/kg)	34,42 ± 14,03	n.s.	124,2 %	23,82 ± 4,69	$p \leq 0,05$	73,7 %
0,9 % NaCl und MC (10 mg/kg)	27,72 ± 3,5		100 %	32,3 ± 10,41		100 %

* Intraperitoneale Injektion der Substanzen (Spalte 1) an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 17.30 Uhr und Messung der Schlaf- und Paralysezeit am 4. Tag um 7.30 Uhr.

Tab. 7:

Hexobarbitalschlaf- und Zoxazolaminparalysezeit nach Injektion von Blei, Blei/Phenobarbital und Blei/Methylcholanthren (in min)

injizierte Substanzen *	Hexobarbital (min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%	Zoxazolamin (min) $\bar{x} \pm s_x$	p	%
Pb (0,6 mg/kg)	45,39 ± 13,68	n.s.	121,3 %	25,14 ± 12,1	$p \leq 0,1$	142,2 %
0,9 % NaCl	37,43 ± 12,21		100 %	17,68 ± 5,37		100 %
Pb (0,6 mg/kg) und PB (50 mg/kg)	17,01 ± 5,69	n.s.	91,6 %	14,16 ± 4,43	n.s.	110,7 %
0,9 % NaCl und PB (50 mg/kg)	18,58 ± 4,87		100 %	12,79 ± 3,78		100 %
Pb (0,6 mg/kg und MC (10 mg/kg)	23,63 ± 13,63	n.s.	105,1 %	23,84 ± 12,56	$p \leq 0,2$	220,1 %
0,9 % NaCl und MC (10 mg/kg)	22,48 ± 7,77		100 %	10,83 ± 4,45		100 %

* Intraperitoneale Injektion der Substanzen (Spalte 1) an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o und Messung der Schlaf- oder Paralysezeit am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Tab. 8:

Relative Lebergewichte, mikrosomale Proteinausbeute und biochemische Parameter nach Injektion von Cadmium (0,3 mg/kg Körpergewicht) und Methylcholanthren (10 mg/kg Körpergewicht)

Injizierte Substanzen*:

Gruppe 1 - 6 : NaCl 0,9 % und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Gruppe 7 - 12 : Cd 0,3 mg/kg Körpergewicht und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Parameter	Gruppe	Ergebnis ($\bar{x} \pm s_x$)	p
rel.Lebergewicht ($\frac{mg\ Leber}{g\ Maus}$)	1 - 6	48,83 ± 4,56	n.s.
	7 - 12	52,52 ± 8,56	
mikrosomale Proteinausbeute ($\frac{mg\ P}{g\ L}$)	1 - 6	12,79 ± o,89	n.s.
	7 - 12	12,51 ± 2,31	

Spezifische Aktivitäten pro:

Parameter	Gruppe	mg Prot.	p	nMol P-450	p	g Leber	p
Cytochrom P-450 (nMol)	1 - 6	o,972± o,127	p ≤ o,o5	./.	./.	1o,48 ± 2,16	n.s.
	7 - 12	o,868± o,o85		./.		1o,72 ± 2,13	
Cytochrom b_5 (nMol)	1 - 6	o,327± o,o42	n.s.	o,34o± o,o52	n.s.	4,183± o,612	n.s.
	7 - 12	o,366± o,o66		o,353± o,o52		3,839± 1,o4o	
Glc.-6-Phosphatase (mU)	1 - 6	37,91 ± 7,93	n.s.	39,58 ±11,46	n.s.	484,87 ±113,28	n.s.
	7 - 12	38,49 ± 6,o2		45,o5 ± 6,72		484,95 ±117,81	
DCPIP-Reduktase (mU)	1 - 6	145,33 ±49,15	n.s.	154,37 ±64,2o	n.s.	1856,4 ±658,7	n.s.
	7 - 12	144,23 ±34,54		171,49 ±49,27		1795,4 ±547,7	
Äthylmorphin-Demethylierg. (mU)	1 - 6	2,943± o,591	n.s.	3,o59± o,5oo	n.s.	38,o7 ± 9,44	n.s.
	7 - 12	2,756± o,6o4		3,26o± o,626		34,88 ± 1o,33	
4-DMAB-Demethylierg. (mU)	1 - 6	2,796± o,852	n.s.	2,891± o,726	n.s.	36,12 ± 11,o3	n.s.
	7 - 12	2,634± o,697		3,o72± o,7oo		32,14 ± 12,o2	
Äthoxycumarin-Deäthylierg. (mU)	1 - 6	o,394± o,o78	n.s.	o,4o6± o,o74	n.s.	5,o5o± 1,211	n.s.
	7 - 12	o,341± o,o83		o,391± o,o79		4,173± 1,o11	
Biphenyl-2-Hydroxylierg. (mU)	1 - 6	1,9o2± o,5o8	n.s.	1,982± o,553	p > o,1	24,35 ± 7,o2	n.s.
	7 - 12	2,o3o± o,377		2,387± o,47o		25,24 ± 5,66	
Biphenyl-4-Hydroxylierg. (mU)	1 - 6	3,198± o,47o	n.s.	3,3oo± o,552	p ≤ o,o5	4o,97 ± 7,42	n.s.
	7 - 12	3,278± o,585		3,831± o,58o		4o,85 ± 9,31	

* Intraperitoneale Injektion an 3 aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr und biochemische Bestimmungen am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Tab. 9:

Relative Lebergewichte, mikrosomale Proteinausbeute und biochemische Parameter nach Injektion von Zink (9 mg/kg Körpergewicht) und Methylcholanthren (10 mg/kg Körpergewicht)

Injizierte Substanzen:*

Gruppe 1 - 6 : NaCl 0,9 % und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Gruppe 7 - 12 : Zn 9 mg/kg Körpergewicht und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Parameter	Gruppe	Ergebnisse ($\bar{x} \pm s_x$)	p
rel.Lebergewichte ($\frac{mg\ Leber}{g\ Maus}$)	1 - 6	5o,9o ± 3,14	$p \leq 0,01$
	7 - 12	45,35 ± 3,92	
mikrosomale Proteinausbeute ($\frac{mg\ P}{g\ L}$)	1 - 6	16,95 ± 2,o5	$p \leq 0,001$
	7 - 12	13,o6 ± 1,73	

Spezifische Aktivitäten pro:

Parameter	Gruppe	mg Prot.	p	nMol P-450	p	g Leber	p
Cytochrom P-450 (nMol)	1 - 6	o,828± o,193	$p \leq$ o,oo1	./.	./.	14,o1 ± 3,32	$p \leq$ o,oo1
	7 - 12	o,468± o,1oo		./.		6,2o ± 1,86	
Cytochrom b_5 (nMol)	1 - 6	o,3o9± o,o73	$p \leq$ o,oo1	o,372± o,o33	n.s.	5,225± 1,36	$p \leq$ o,oo1
	7 - 12	o,158± o,o31		o,346± o,o85		2,o54± o,54	
Glc.-6-Phosphatase (mU)	1 - 6	26,o9 ± 5,8o	$p \leq$ o,oo1	32,84 ± 9,289	$p \geq$ o,1	446,5 ±134,9	$p \leq$ o,oo1
	7 - 12	17,91 ± 2,oo		39,362± 7,228		235,2 ± 47,2	
DCPIP-Reduktase (mU)	1 - 6	83,98 ±36,7o	n.s.	1o3,47 ±42,76	$p \leq$ o,o5	1442,9 ±712,o	$p \leq$ o,o5
	7 - 12	66,42 ± 9,39		151,67 ±45,59		884,7 ±168,6	
Äthylmorphin-Demethylierg. (mU)	1 - 6	3,699± 1,422	$p \leq$ o,o5	4,78 ± 2,46	n.s.	63,o8 ± 24,49	$p \leq$ o,o1
	7 - 12	1,993± 1,569		4,75 ± 4,52		25,76 ± 2o,73	
4-DMAB-Demethylierg. (mU)	1 - 6	o,777± o,295	$p \leq$ o,oo1	o,925± o,328	$p \geq$ o,1	13,33 ± 5,72	$p \leq$ o,oo1
	7 - 12	o,3o3± o,139		o,658± o,28o		4,o8 ± 2,19	
Äthoxycumarin-Deäthylierg. (mU)	1 - 6	o,328± 1,4oo	$p \leq$ o,oo1	o,393± o,o74	n.s.	5,7o8± 1,993	$p \leq$ o,oo1
	7 - 12	o,163± o,o63		o,346± o,o88		2,19o± 1,1oo	
Biphenyl-2-Hydroxylierg. (mU)	1 - 6	1,671± o,531	$p \leq$ o,o5	2,oo8± o,461	n.s.	28,47 ± 1o,o3	$p \leq$ o,o1
	7 - 12	1,12o± o,594		2,363± 1,o58		15,o9 ± 9,22	
Biphenyl-4-Hydroxylierg. (mU)	1 - 6	3,o68± o,868	$p \leq$ o,o1	3,676± o,595	n.s.	51,79 ± 15,o6	$p \leq$ o,o1
	7 - 12	1,749± o,933		3,699± 1,63o		23,84 ± 15,14	

* Intraperitoneale Injektion an 3 aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr und biochemische Bestimmungen am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Tab. 10

Relative Lebergewichte, mikrosomale Proteinausbeute und biochemische Parameter nach Injektion von Kupfer (1 mg/kg Körpergewicht) und Methylcholanthren (10 mg/kg Körpergewicht)

Injizierte Substanzen*:

Gruppe 1 - 6 : NaCl 0,9 % und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Gruppe 7 - 12 : Cu 1 mg/kg Körpergewicht und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Parameter	Gruppe	Ergebnis ($\bar{x} \pm s_x$)	p
rel.Leber-gewicht ($\frac{mg\ Leber}{g\ Maus}$)	1 - 6	5o,35 ± 4,58	n.s.
	7 - 12	52,14 ± 3,45	
mikrosomale Proteinausbeute ($\frac{mg\ P}{g\ L}$)	1 - 6	13,43 ± 2,81	n.s.
	7 - 12	12,82 ± 2,61	

Spezifische Aktivitäten pro:

Parameter	Gruppe	mg Prot	p	nMol P-450	p	g Leber	p
Cytochrom P-450 (nMol)	1 - 6	o,894± o,165	n.s.	./.	./.	12,21 ± 3,96	n.s.
	7 - 12	o,814± o,1oo		./.			
Cytochrom b_5 (nMol)	1 - 6	o,257± o,o71	n.s.	o,286± o,o49	n.s.	3,452± 1,1o3	n.s.
	7 - 12	o,258± o,o46		o,319± o,o57		3,35o± 1,o74	
Glc.-6-Phosphatase (mU)	1 - 6	31,28 ± 3,94	n.s.	31,79 ± 4,4o	n.s.	471,56 ±126,o	n.s.
	7 - 12	27,82 ± 1,63		36,39 ± 5,86		416,47 ± 45,24	
DCPIP-Reduktase (mU)	1 - 6	123,94 ±24,52	n.s.	142,87 ±36,54	n.s.	1686,5 ±54o,4	n.s.
	7 - 12	12o,19 ±2o,92		149,29 ±28,25		1561,6 ±53o,5	
Äthylmorphin-Demethylierg. (mU)	1 - 6	3,19 ± o,67	n.s.	3,62 ± o,72	n.s.	43,46 ± 14,6	n.s.
	7 - 12	2,76 ± o,62		3,38 ± o,65		35,12 ± 1o,84	
4-DMAB-Demethylierg. (mU)	1 - 6	2,338± o,415	n.s.	2,693± o,64o	n.s.	31,43 ± 8,59	n.s.
	7 - 12	2,476± o,3oo		3,o83± o,54o		31,29 ± 4,86	
Äthoxycumarin-Deäthylierg. (mU)	1 - 6	o,444± o,121	n.s.	o,446± o,1o5	n.s.	6,61o± 2,o47	n.s.
	7 - 12	o,348± o,o52		o,45o± o,o54		5,27o± 1,249	
Biphenyl-2-Hydroxylierg. (mU)	1 - 6	1,528± o,5o5	n.s.	1,696± o,365	p ≦ o,o5	2o,93 ± 9,1o	n.s.
	7 - 12	1,731± o,352		2,171± o,6o5		21,85 ± 8,55	
Biphenyl-4-Hydroxylierg. (mU)	1 - 6	2,78o± 1,oo7	n.s.	3,o77± o,768	n.s.	38,15 ± 17,61	n.s.
	7 - 12	2,674± o,698		3,349± 1,o14		35,52 ± 15,28	

* Intraperitoneale Injektion an 3 aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr und biochemische Bestimmungen am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Tab. 11:

Hemmung der mikrosomalen Aktivität der O-Deäthylierung von 7-Äthoxycumarin nach Zusatz von αNF und MP (in %)

Injizierte Substanzen*:
Gruppe 1 - 6 : NaCl 0,9 % und MC 10 mg/kg Körpergewicht
Gruppe 7 - 12 : Cd 0,3 mg/kg und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Tiernummer	1 - 6	7 - 12
ohne Zusatz	1oo %	1oo %
1oo µM MP im Test	54 %	32,5 %
5o µM αNF im Test	16 %	14,4 %

Tab. 12:

Injizierte Substanzen*:
Gruppe 1 - 6 : NaCl 0,9 % und MC 10 mg/kg Körpergewicht
Gruppe 7 - 12 : Zn 9 mg/kg und MC 10 mg/kg Körpergewicht

Tiernummer	1 - 6	7 - 12
ohne Zusatz	1oo %	1oo %
1oo µM MP im Test	53 %	28,15 %
5o µM αNF im Test	11,25 %	9,35 %

* Intraperitoneale Injektion an 3 aufeinanderfolgenden Tagen um 17.3o Uhr und biochemische Bestimmungen am 4. Tag um 7.3o Uhr.

Lebenslauf

Am 22. November 1954 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Erich Welbers und seiner Ehefrau Cäcilie Welbers, geb. Krings, in Düsseldorf geboren.
Von 1961 - 1965 besuchte ich die Städtische Volksschule an der Kronprinzenstraße und von 1965 - 1973 das Staatliche Görresgymnasium, an dem ich 1973 meine Reifeprüfung ablegte.
Nach dem Abitur leistete ich 15 Monate Grundwehrdienst in Wesel ab.

Im Sommersemester 1975 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf, wo ich im November 1981 den dritten Teil der ärztlichen Prüfung ablegte.
Seit Januar 1982 arbeite ich im Dominikus-Krankenhaus in Düsseldorf-Heerdt als Assistenzarzt für Anästhesiologie.